

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860099

研究課題名(和文)慢性腎障害患者での肝輸送体OATP機能低下の機序と血漿中薬物濃度変化の定量的予測

研究課題名(英文)Inhibitory mechanisms of hepatic uptake transporters/OATP during renal failure

研究代表者

増尾 友佑 (MASUO, YUSUKE)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：90708140

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)：一部の肝消失型薬物は、血中消失が慢性腎障害患者で遅延し、この原因として患者血漿中で蓄積する一部の尿毒素による肝膜輸送体のdirect inhibitionが報告されているが、他の尿毒素による阻害やdirect inhibition以外の作用は未解明である。本研究では、p-cresyl sulfateによる肝膜輸送体OATP1B1のdirect inhibitionとindoxyl sulfateによるOATP1B1のlong-lasting inhibitionを明らかにした。本研究で明らかになった阻害作用は、慢性腎障害時におけるOATP1B1基質薬の血中消失の遅延を一部説明しうるものである。

研究成果の概要(英文)：Several uremic toxins have been proposed to inhibit hepatic uptake transporters. The purpose is to clarify possible long-lasting inhibition of OATP1B1 by uremic toxins. OATP1B1-mediated uptake of [3H]estron sulfate (E3S) was examined after co-incubation or preincubation with uremic toxins in HEK293/OATP1B1 cells and primary cultured human hepatocytes. Among 21 uremic toxins, indoxyl sulfate (IS), CMPF and p-cresyl sulfate directly inhibited OATP1B1 mediated-uptake of E3S, but only IS exhibited inhibitory effect even after preincubation. Such inhibition of E3S uptake by preincubation with IS was more remarkable than that by its co-incubation, and observed in preincubation time- and concentration-dependent manners. Preincubation with IS also decreased uptake of E3S in human hepatocytes in primary culture. Overall, the long-lasting inhibition in the presence of IS could at least partially explain the delayed elimination of OATP1B1 substrate drugs during severe renal failure.

研究分野：薬物治療学

キーワード：トランスポーター 慢性腎障害 尿毒素

1. 研究開始当初の背景

慢性腎障害は、糸球体濾過量等の腎機能の低下が3ヶ月以上持続する疾患である。本邦成人の8人に1人が慢性腎障害に罹患しているとされ、その患者数は増加傾向にある。一方で、慢性腎障害の根本治療は腎移植のみであるが、移植での治療例は少ないため、患者の多くは生涯にわたり慢性腎障害を罹患する。そのため患者は、生活習慣病等、他疾患の治療目的で薬物を服用する可能性が高い。しかし、慢性腎障害時の薬物の体内動態は、一部の薬剤のみでしか詳細に検討されておらず、患者数の多さと疾患の難治性を考慮すると、慢性腎障害時の適切な薬物投与量設計は急務である。

主として腎臓から排泄される薬物(腎排泄型薬物)は、腎機能の低下に伴って排泄が低下し、血漿中からの消失の遅延が予測されるため、腎機能に応じた投与量設計が重要視されてきた。一方で、主として肝臓に取り込まれ代謝・排泄される薬物(肝消失型薬物)の体内動態は、従来、腎機能の影響を受けにくいとされてきた。しかし、抗がん剤イリノテカン塩酸塩(CPT-11)の活性代謝物 SN-38、抗糖尿病薬 repaglinide、脂質異常症治療薬 rosuvastatin 等の肝消失型薬物は、慢性腎障害患者において血漿中からの消失が遅延し、特に SN-38 では腎障害患者での骨髄抑制が報告されている(Drug Matab Dispos 39(2) 2011, Clin Pharmacol Ther 67(1) 2000, Curr Med Res Opin 24(9) 2008)。慢性腎障害患者血漿中に蓄積する尿毒素の一部が、肝臓の薬物取り込み輸送体(OATP1B1)を直接阻害すること、および慢性腎障害患者血漿成分がヒト初代培養肝細胞の OATP1B1 発現を低下させることが既に報告されている(Pharm Res 31(1) 2014)。しかし、これらのメカニズムが SN-38 の血中消失遅延をどの程度説明しうるかや、他の尿毒素成分の影響、直接阻害以外のメカニズム等は依然不明である。

2. 研究の目的

本研究は、慢性腎障害患者における OATP1B1 の機能低下メカニズムの解明を目的とする。OATP1B1 の機能低下機序を網羅的に解明するため、OATP1B1 の機能低下を及ぼしうる要因を列挙し、慢性腎障害時に血

液中に蓄積する尿毒素がそれぞれの要因に及ぼす影響を調べる。具体的な要因として、直接の機能阻害と転写制御に焦点を当て、尿毒素または慢性腎障害患者より採取した血漿による変動、その変動メカニズムを解明する。網羅的解析に適した系として、ヒト OATP1B1 遺伝子導入細胞を用いる。続いて、解明した各要素が、ヒト肝臓において OATP1B1 の機能低下に寄与するかを、ヒト初代培養肝細胞を用いて検証する。ヒト初代培養肝細胞は、動物間の種差や株化培養細胞で生じる発現低下の影響が少なく、ヒト *in vivo* に最も近い評価系である。尿毒素または慢性腎障害患者血漿によって、解明した各要素が変動するかを検証するとともに、OATP1B1 の機能低下が生じるかを調べる。

本研究は、慢性腎障害時の OATP1B1 の阻害様式に着目した研究であるが、OATP1B1 は多くの薬物の肝取り込みに重要な役割を果たすことから、本研究で解明するメカニズムは複数の OATP1B1 基質薬に対しても普遍的なものである。従って、慢性腎障害患者における OATP1B1 基質薬の体内動態変化についても有益な情報を与える。さらに本研究は、患者血漿や尿毒素に焦点を当てたメカニズム解析であるので、他の輸送体や薬物代謝酵素に対する同様のメカニズム解析研究にも、本研究で確立した手法を用いて発展させることができる。

3. 研究の方法

(1) OATP1B1 を阻害する尿毒素のスクリーニング

OATP1B1 安定発現細胞(HEK293/OATP1B1)への [³H] estron-3-sulfate ([³H]E3S, OATP1B1 典型的基質)の取り込みに対する各種尿毒素の阻害活性を検討した。尿毒素は、1000 μM indoxyl sulfate、300 μM CMPF、1000 μM *p*-cresyl sulfate、3000 μM hippuric acid、100 μM indole acetic acid、200 μM homocysteine、200 μM *p*-OH hippuric acid、10 μM *trans*-aconitate、400 μM *p*-cresol、4 nM melatonin、400 nM spermine、2 μM methylglyoxal、2 μM putrescine、3 μM 2-methoxyresorcinol、3 μM hydroquinone、5 μM glyoxal、5 μM kynurenine、20 μM quinolinic acid、25 μM 3-deoxyglucosone、40 μM Nε-(carboxymethyl)-lysine、50 μM kynurenic

acid を用い、これらの尿毒素はヒト臨床で報告されている最高血漿中濃度で添加した。また、尿毒素による direct inhibition と preincubation 依存的な阻害の両者を評価するために、尿毒素は preincubation 時のみと、取り込み実験時のみのそれぞれで添加した。

(2) indoxyl sulfate による OATP1B1 の阻害様式

OATP1B1 に対して long-lasting inhibition をかけた indoxyl sulfate についてより詳細な阻害メカニズムを検討するため、indoxyl sulfate との preincubation 時間依存性、 K_m および V_{max} の算出、indoxyl sulfate に暴露後の取り込み活性の回復を検討した。

(3) ヒト初代培養肝細胞における indoxyl sulfate による OATP1B1 の long-lasting inhibition

OATP1B1 発現系で確認された OATP1B1 の long-lasting inhibition が、ヒトの生理学的な肝臓で生じるかをヒト初代培養肝細胞で検証した。indoxyl sulfate を基質 $[^3H]E3S$ との preincubation 中または incubation 中にそれぞれ添加し、 $[^3H]E3S$ の取り込み活性を測定した。 $[^3H]E3S$ 取り込み活性の変動が、OATP1B1 mRNA 発現量変動によるものかを調べるため、OATP1B1 mRNA を定量 PCR で測定した。

(4) 尿毒素によるヒト初代培養肝細胞での肝膜輸送体、肝薬物代謝酵素の mRNA 発現量変動

ヒト初代培養肝細胞を各種尿毒素または慢性腎障害患者より採取した血漿と培養し、肝膜輸送体または肝薬物代謝酵素の mRNA を定量 PCR で測定した。

4. 研究成果

(1) OATP1B1 を阻害する尿毒素のスクリーニング

21 種類の尿毒素をヒト臨床で報告されている最大血漿中濃度で基質 $[^3H]E3S$ との incubation 中に添加したところ、1 mM indoxyl sulfate、300 μM CMPF、1 mM *p*-cresyl sulfate は、 $[^3H]E3S$ の取り込み活性を、尿毒素非添加時と比較してそれぞれ 45, 55, 40%まで低下させた。indoxyl sulfate と CMPF による OATP1B1 の direct inhibition は既報と同様であったが(Pharm Res 31(1) 2014)、*p*-cresyl

sulfate による OATP1B1 の阻害は本研究が初めてである。尿毒症物質は、慢性腎障害患者の体内に長時間滞留し、OATP1B1 は尿毒症物質にさらされるため、direct inhibition 以外に不可逆的な阻害(long-lasting inhibition)を引き起こす可能性がある。そこで基質 $[^3H]E3S$ との incubation 24 時間前に尿毒素を添加し、基質との incubation 時には尿毒症物質を wash out した際の long-lasting inhibition についても評価した。検討した 21 種類の尿毒素のうち、1 mM indoxyl sulfate は、preincubation 時のみに添加した際においても、基質 $[^3H]E3S$ の取り込み活性を control と比較して 35%阻害した。この 1 mM indoxyl sulfate による long-lasting inhibition (35%)は、direct inhibition (55%)よりも強い阻害作用であった。IS 以外の尿毒素は、ヒト臨床で報告されている最大血漿中濃度において、long-lasting inhibition を示さなかった。

(2) indoxyl sulfate による OATP1B1 の阻害様式

HEK293/OATP1B1 細胞を用いて、indoxyl sulfate の 2 分から 24 時間の preincubation 時間での阻害活性を比較したところ、2 分から 24 時間までの preincubation 時間依存的に $[^3H]E3S$ の取り込み阻害活性がゆるやかに強まった。一方で、cyclosporin A は、既報と同様に(Drug Metab Pharmacokinet. 27(4) 2012)、30 分以内と速やかに $[^3H]E3S$ の取り込みを阻害し、preincubation 時間を 30 分以上に延長しても阻害活性は強まらなかった。

indoxyl sulfate による OATP1B1 の direct inhibition と long-lasting inhibition での阻害様式を検討するために、 $[^3H]E3S$ の OATP1B1 依存的な取り込みに対する V_{max} および K_m を、long-lasting inhibition と direct inhibition とで算出した。Long-lasting inhibition では、indoxyl sulfate 非添加群($K_m = 115 \pm 16.5$ nM, $V_{max} = 5.2 \pm 0.5$ pmol/min/mg protein)と比較して、 V_{max} は変化せず ($V_{max} = 5.0 \pm 1.2$ pmol/min/mg protein)、 K_m が増加した($K_m = 378 \pm 105$ nM)。一方で、direct inhibition では、IS 非添加群と比較して、 V_{max} と K_m のいずれも変化しなかった ($V_{max} = 5.4 \pm 0.8$ pmol/min/mg protein, $K_m = 166 \pm 32.6$ nM)。

indoxyl sulfate による OATP1B1 の long-lasting inhibition の不可逆性について検討すべく、indoxyl sulfate または cyclosporin A

を培地中に1時間のみ一過性に添加して wash out した後に、3, 6, 18, 24, 48 時間培養し、 ^3H E3S の取り込み活性を評価した。その結果、indoxyl sulfate との preincubation 終了後 48 時間後まで、 ^3H E3S 取り込み活性の阻害は持続し、 ^3H E3S 取り込み活性は回復しなかった。一方、cyclosporin A は、既報と同様に(Drug Metab Pharmacokinet. 27(4) 2012)、preincubation 終了後にゆるやかに ^3H E3S 取り込み活性が回復した。indoxyl sulfate による OATP1B1 の long-lasting inhibition は不可逆的であることが示された。

(3) ヒト初代培養肝細胞における indoxyl sulfate による OATP1B1 の long-lasting inhibition

1 mM indoxyl sulfate をヒト初代培養肝細胞の preincubation 中に添加した場合には、 ^3H E3S 取り込みが非添加群と比較して有意に 60%まで低下した。一方、1 mM indoxyl sulfate を ^3H E3S との incubation 中に添加した場合には、 ^3H E3S 取り込みがコントロール群と比較して 85%と低下傾向であった。また、本実験で用いたヒト初代培養肝細胞ロットでは indoxyl sulfate 非添加群と添加群で OATP1B1 mRNA 発現量は変化せず、初代培養肝細胞を 1 mM indoxyl sulfate に 48 時間暴露させても OATP1B1 mRNA 発現量は低下しなかった。以上より、1 mM indoxyl sulfate を preincubation 中に添加した際に生じた ^3H E3S 取り込み低下は、OATP1B1 mRNA 発現量の低下に起因するのではなく、ヒト初代培養肝細胞においても indoxyl sulfate は OATP1B1 を long-lasting inhibition することが示された。

(4) 尿毒素によるヒト初代培養肝細胞での肝膜輸送体、肝薬物代謝酵素の mRNA 発現量変動

尿毒素 indoxyl sulfate は、ヒト初代培養肝細胞において、肝膜輸送体 OATP1B3 および肝薬物代謝酵素 CYP3A4 の mRNA 発現量を低下させた。一方で、慢性腎障害患者より採取した血漿は、OATP1B1、OATP1B3、CYP3A4 の mRNA 発現量を低下させた。慢性腎障害患者の血漿中には、OATP1B1 の mRNA 発現量を低下させうる indoxyl sulfate 以外の尿毒素が含まれていることが判明し、今後この尿毒

素の同定を進める必要がある。

慢性腎障害患者での indoxyl sulfate の血漿中濃度は約 100 μM であるが、患者によっては 1000 μM との報告もある。また、indoxyl sulfate は肝臓内で合成されるため、肝細胞外液中では循環血中に比べ高濃度の indoxyl sulfate が存在する可能性がある。さらに、生体内で OATP1B1 は常に血漿中の indoxyl sulfate にさらされていることから、ヒト *in vivo* でも preincubation 時間依存的な阻害が生じる可能性がある。一方、本研究で見られた indoxyl sulfate の阻害効果は部分的なものであり、慢性腎障害患者での SN-38 の血漿中濃度上昇のすべてを説明できるものではないと考えられ、その他の未知の尿毒素による阻害効果についてさらに検討を進める必要がある。

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6件)

Tang Y, Masuo Y, Sakai Y, Wakayama T, Sugiura T, Harada R, Futatsugi A, Komura T, Nakamichi N, Sekiguchi H, Sutoh K, Usumi K, Iseki S, Kaneko S, Kato Y. Localizatoin of xenobiotic transporter OCTN1/SLC22A4 in hepatic stellate cells and its protective role in liver fibrosis. *J Pharm Sci* 105(5): 1779-1789, 2016.

査読有、doi:10.1016/j.xphs.2016.02.023

Fujita K, Masuo Y, Okumura H, Watanabe Y, Suzuki H, Sunakawa Y, Shimada K, Kawara K, Akiyama Y, Kitamura M, Kunishima M, Sasaki Y, Kato Y. Increased plasma concentrations of unbound SN-38, the active metabolite of irinotecan, in cancer patients with severe renal failure. *Pharm Res* 33(2): 269-282, 2016.

査読有、doi:10.1007/s11095-015-1785-0

Shimizu T, Kijima A, Masuo Y, Ishimoto T, Sugiura T, Takahashi S, Nakamichi N, Kato Y. Gene ablation of carnitine/organic cation transporter 1 reduces

gastrointestinal absorption of 5-aminosalicylate in mice. *Biol Pharm Bull* 38(5): 774-780, 2015.
査読有、doi:10.1248/bpb.b15-00109

Shimizu T, Masuo Y, Takahashi S, Nakamichi N and Kato Y. Organic Cation Transporter Octn1-mediated Uptake of Food-derived Antioxidant Ergothioneine into Infiltrating Macrophages during Intestinal Inflammation in Mice. *Drug Metab Pharmacokinet* 30(3): 231-239, 2015.
査読有、doi:10.1016/j.dmpk.2015.02.003

Ishimoto T, Nakamichi N, Hosotani H, Masuo Y, Sugiura T and Kato Y. Organic cation transporter-mediated ergothioneine uptake in mouse neural progenitor cells suppresses proliferation and promotes differentiation into neurons. *PLoS One* 9: e89434, 2014.
査読有、doi:10.1371/journal.pone.0089434

Takeuchi K, Sugiura T, Matsubara K, Sato R, Shimizu T, Masuo Y, Horikawa M, Nakamichi N, Ishiwata N and Kato Y. Interaction of novel platelet-increasing agent eltrombopag with rosuvastatin via breast cancer resistance protein in human. *Drug Metab Dispos* 42: 726-734, 2014.
査読有、doi:10.1124/dmd.113.054767

〔学会発表〕(計8件)

長谷川葵、増尾友佑、永森収志、林和輝、中道範隆、金井好克、加藤将夫：ヒト肝ミクロソームを用いたモノアミン酸化酵素基質薬の in vivo 代謝安定性予測 日本薬学会第136年会 2016.3.26-29 パシフィコ横浜 横浜

小木達也、増尾友佑、藤田健一、北村正典、中道範隆、佐々木康綱、国嶋崇隆、加藤将夫：内因性尿毒症物質インドキシル硫酸による OATP1B1 の long-lasting inhibition 日本薬物動態学会第30回年会 2015.11.12-14 タワーホール船堀 東京

大庭悠里、増尾友佑、山田耕平、中道範

隆、国嶋崇隆、加藤将夫：メタボローム解析による膜輸送体 SLC22A4 の糖代謝への関与の探索 日本薬物動態学会第30回年会 2015.11.12-14 タワーホール船堀 東京

二木梓、増尾友佑、中道範隆、加藤将夫：膜輸送体 OCTN1 遺伝子変異体によるピグアニドの輸送特性 日本薬物動態学会第30回年会 2015.11.12-14 タワーホール船堀 東京

Tang Y, Masuo Y, Nakamichi N, Kato Y: Functional Expression of Carnitine/organic Cation Transporter OCTN1/SLC22A4 in Hepatic Stellate Cell. 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 2015.10.25-29, Orange Country Convention Center, Orlando, USA.

小木達也、増尾友佑、藤田健一、北村正典、奥村英典、中道範隆、佐々木康綱、国嶋崇隆、加藤将夫尿毒症物質による肝膜輸送体 OATP1B1 の阻害様式 第36回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2014.11.20-21 徳島大学大塚講堂 徳島

Hayashi Y, Masuo Y, Nakamichi N, Kato Y: Extrapolation of hepatic clearance for the drugs metabolized by monoamine oxidase from in vitro data. 19th North American Regional ISSX Meeting and 29th JSSX Annual Meeting, 2014.10.19-23, Hilton San Francisco, San Francisco, USA

Masuo Y, Kawabata S, Nakamichi N, Kato Y: Functional characterization of organic cation transporter OCTN1 with single nucleotide polymorphisms. 19th North American Regional ISSX Meeting and 29th JSSX Annual Meeting, 2014.10.19-23, Hilton San Francisco, San Francisco, USA

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunyaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増尾 友佑 (MASUO YUSUKE)

金沢大学・薬学系・助教
研究者番号：90708140