

令和元年6月12日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15535

研究課題名(和文) PETを基盤とした慢性腎臓病時の薬物トランスポーター活性と臓器連関研究

研究課題名(英文) Study on transporter activities and its interactions between organ systems in chronic kidney disease by positron emission tomography

研究代表者

金子 健一 (Kaneko, Kenichi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：30776513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：複数の臓器中薬物濃度を同時かつ経時的に定量評価が可能な陽電子断層撮影法(PET)を用い慢性腎臓病モデルラットにおいて、 $[^{18}\text{F}]$ Pitavastatinの肝臓、腎臓および胆汁中濃度を定量化することに成功した。さらに、正常ラットと慢性腎臓病モデルラットの血中濃度推移に変化は認められなかったが、腎排泄が低下することを証明できた。これらの結果より、PETを用いると従来の血中濃度の評価のみでは、評価が難しい臓器クリアランスの変化を評価することができることから、臓器中の薬物濃度を経時的に定量することは非常に有用であるということを証明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器中の薬物濃度を経時的に定量することで、血中濃度の変化を伴わない臓器クリアランス低下を評価できたこと、更なる検討が必要ではあるが、慢性腎臓病時には、血中および臓器中薬物濃度だけではなく、薬物の血清タンパク結合率および血中の尿毒症物質濃度も合わせて評価する必要があることを示すことができたという点で、臨床応用に向けた基盤構築をする上で非常に有用であったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the concentration of $[^{18}\text{F}]$ Pitavastatin in the liver, kidney and bile of model rats with chronic kidney disease (CKD) was quantitatively measured by PET imaging. We show that the excretion of $[^{18}\text{F}]$ Pitavastatin from kidney decreased in the model rats with CKD compared with the sham rats although there was almost no difference between the blood concentration of $[^{18}\text{F}]$ Pitavastatin in the model rats with CKD and that in the sham rats. These results indicate that PET can evaluate the change of organ clearance that it is not easy to analyze from the only measurement of drug concentration in blood. Therefore, this study provides important information on the quantitative and serial measurement of drug concentration in organs.

研究分野：薬物動態学

キーワード：PET 薬物トランスポーター 慢性腎臓病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性腎臓病時の腎機能の低下が腎臓以外の臓器のクリアランスも低下させることが明らかになっている。一方、従来 *in vivo* における各臓器の各トランスポーター活性については、臓器内薬物濃度が測定できないため直接的な評価は不可能であり、「血中」「尿中」薬物濃度より算出した全身、腎臓および腎臓以外の臓器クリアランス（腎外クリアランス）による推定法でのみ評価されていた。さらに、薬物血中濃度にはトランスポーター活性変化が反映されない場合があるため、臓器内薬物濃度を測定し、直接評価することは慢性腎臓病患者において腎外クリアランス低下の原因を究明する上で必須である。以上の背景をもとに本研究では、慢性腎臓病において医薬品の適正使用上、*in vivo* トランスポーター活性評価は急務の課題と考え、その評価方法として、複数の臓器中薬物濃度を同時かつ経時的に定量評価が可能な陽電子断層撮影法（PET）を用い、トランスポーター活性の直接評価法及び臓器連関評価を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、OATPs および BCRP の基質である^[18F]Pitavastatin を用いた PET により慢性腎臓病モデルラットの各臓器におけるトランスポーター活性及び臓器連関を評価し、臨床応用に向けた基盤構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 5/6 腎臓摘出による慢性腎臓病モデルラットの作製

汎用されている慢性腎臓病モデルの作製方法である 5/6 腎臓摘出法により慢性腎臓病モデルラットを作製した。Wistar 系ラットを 4 週齢で左腎の 2/3 を摘出し、1 週間後に右腎を全摘することで 5/6 腎臓摘出により慢性腎臓病モデルラットを作製した。Sham ラットは、慢性腎臓病モデルラットと同じタイミングで腎臓近くを切開し、腎臓を摘出しないで縫合することで作製した。モデルが作製できているかを判定するため、体重、腎機能マーカーである血清尿素窒素、血中クレアチニン濃度および尿中総タンパク質濃度をウレアーゼ GLDH 法、クレアチニナーゼ・HMMPs 法およびピロガロールレッド法により測定した。また、尿量よりクレアチニンクリアランスも算出した。なお、PET 実験には、5/6 腎臓摘出後、12~15 週経過し、血清クレアチニン濃度が 1.5 mg/dL 以上の重度に腎機能が低下しているラットを使用した。

(2) PET imaging 法に用いるトランスポーター-PET プローブの代謝安定性評価

PET で得られるデータをより詳細に考察するため、まず体内での^[18F]Pitavastatin の安定性を評価した。大腿動脈および胆管にカニューレを留置した慢性腎臓病モデルラットおよび正常ラットに^[18F]Pitavastatin を静脈内投与し、経時的に血液および胆汁を採取し、試料を調製し、薄層クロマトグラフィー（TLC）にて分析した。

(3) PET imaging 法による肝臓および腎臓中薬物濃度の定量評価によるトランスポーター活性評価

OATPs および BCRP の基質である^[18F]Pitavastatin を慢性腎臓病モデルラットに静脈内投与し、肝臓および腎臓の PET 撮像を行った。得られた PET 画像を解析することにより、肝臓、腎臓および胆汁中濃度を定量化した。また、大腿動脈にカニューレを留置し、PET 撮像時に経時的に採血し、その試料を γ カウンターで測定することで血中濃度を算出した。経時的にこれらの濃度推移を正常ラット（Sham）と比較することにより慢性腎臓病モデルラットの OATPs および BCRP 活性に関する情報を得た。

4. 研究成果

(1) 5/6 腎臓摘出による慢性腎臓病モデルラットの作製

慢性腎臓病モデル作製後、12～15 週経過したラットを PET 実験前に体重および腎機能マーカーである血清クレアチニン濃度、血清尿素窒素濃度、クレアチニンクリアランスおよび尿中総タンパク質濃度を測定し、慢性腎臓病モデルの状態を確認した。その結果、表 1 に示すように、正常ラットと比較して、慢性腎臓病ラットでは、血清クレアチニン濃度、血清尿素窒素濃度、尿中総タンパク質濃度が有意に増加し、クレアチニンクリアランスは、有意に減少した。また、体重についても減少傾向が観察された。さらに、これらの結果は、これまで報告された文献値^{1, 2)}とほぼ同等であった。以上より、慢性腎臓病モデルラットは適切に慢性腎臓病の状態となっていることが確認できた。

表 1 慢性腎臓病モデルラットの生化学検査値

	Sham	CKD
体重 (g)	335 ± 1	269 ± 45
血清クレアチニン濃度 (mg/dL)	0.28 ± 0.01	2.38 ± 0.62*
血清尿素窒素濃度 (mg/dL)	16.2 ± 0.9	138 ± 33*
クレアチニンクリアランス (mL/min/kg)	6.29 ± 0.66	1.00 ± 0.49**
尿中総タンパク質濃度 (mg/dL)	149 ± 11	695 ± 66**

The data represent Mean ± S.E. (n=3), *, p<0.05, **, p<0.01 as compared with sham rats.
Sham: 正常ラット, CKD: 慢性腎臓病モデルラット

(2) PET imaging 法に用いるトランスポーターPET プローブの代謝安定性評価

慢性腎臓病モデルラットおよび正常ラットの経時的に採取した血漿および胆汁より試料を調製し TLC により分離後、TLC プレート上の放射活性から^{[18F]Pitavastatin}の体内代謝安定性を評価した。その結果、慢性腎臓病モデルラット、正常ラットいずれにおいても、血漿および胆汁試料で^{[18F]Pitavastatin}の標準試料と同じ位置に放射能スポットが認められた。本結果より、^{[18F]Pitavastatin}は慢性腎臓病モデルラットにおいても正常ラット同様、体内で安定であり、PET を用いた薬物動態評価に適したプローブであることを証明することができた。

(3) PET imaging 法による肝臓および腎臓中薬物濃度の定量評価によるトランスポーター活性評価

慢性腎臓病モデルラットおよび正常ラットにおいて^{[18F]Pitavastatin}の体内動態を比較するため、PET 画像から、肝臓、腎臓および胆汁中の放射活性の時間推移を定量化し、得られたデータから薬物動態解析を行った結果、慢性腎臓病モデルでは腎臓内^{[18F]Pitavastatin}濃度が、正常ラットと比較して、低下していることが確認された。一方で、血中、肝臓および胆汁中濃度については、ほぼ同じ推移を示した。本結果より、腎機能の低下に伴い、^{[18F]Pitavastatin}の腎排泄が低下すること明らかになった。今回の結果では、慢性腎臓病モデルラットと正常ラットにおいて血中濃度が、ほぼ同等であったことを考えると、血中濃度のみの比較からでは、腎排泄の低下を示唆することは難しかったと考えられることから、臓器中の薬物濃度を経時的に定量することは非常に有用であることを証明することができた。

臓器関連評価という観点で考えた場合、^{[18F]Pitavastatin}の体内動態は、PET による評価においては、腎臓以外のクリアランスに低下が認められなかった。一方で、PET の結果は、タンパク結合型薬物とタンパク非結合型薬物の両方を評価していることに注意が必要である。^{[18F]Pitavastatin}のタンパク結合率は非常に高く、同様にタンパク結合率が高い肝代謝型薬物として知られる抗がん剤イリノテカンの活性代謝物である SN-38 は、腎機能が正常なガン患者と腎機能が低下しているガン患者で、タンパク非結合型の薬物の血中濃度推移に差が認められるということが報告されている³⁾。この差については、腎機能低下時に増加する尿毒症物質による血清タンパク結合の阻害および肝臓 OATPs 阻害の関与が示唆されていることから、慢性腎臓病モデルラットの血清タンパク結合率、血中尿毒症物質濃度も合わせて評価する必要があると考えられる。今後、PET データと合わせて評価が必要なデータを示すことができたという点で本検討は、臨床応用に向けた基盤構築をする上で非常に有用であったと考えられる。

[参考文献]

- 1) Deguchi T et al., J Pharmacol Exp Ther 314: 932-938, 2005.
- 2) Shimoishi K et al., Pharm Res 24: 1283-1289, 2007
- 3) Fujita K et al., Pharm Res 33: 269-282, 2016

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

- (1) Ken-ichi Kaneko, Masaaki Tanaka, Akira Ishii, Takayoshi Nakaoka, Satsuki Irie, Yasuhiro Wada, Takeshi Miyake, Kota Toshimoto, Kazuya Maeda, Yilong Cui, Masaru Enomoto, Etsushi Kawamura, Norifumi Kawada, Joji Kawabe, Hiroyuki Kusuvara, Yuichi Sugiyama, and Yasuyoshi Watanabe. A clinical quantitative evaluation of hepatobiliary transport of [¹¹C]Dehydropravastatin in humans using positron emission tomography, 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX [Kanazawa], October 1-5, 2018
- (2) Takayoshi Nakaoka, Ken-ichi Kaneko, Satsuki Irie, Emi Yamano, Yasuhiro Wada, Aya Mawatari, Ami Igesaka, Hisashi Doi, Yuta Uetake, Hidenori Ochiai, Takashi Niwa, Takamitsu Hosoya, Masaaki Tanaka, Kohei Kotani, Joji Kawabe, Yuichi Sugiyama, Yasuyoshi Watanabe. Clinical evaluation of [¹⁸F]Pitavastatin for quantitative analysis of hepatobiliary transporter activity, 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX [Kanazawa], October 1-5, 2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 渡辺 恭良; 崔 翼龍; 細谷 孝充; 土居 久志; 丹羽 節; 植竹 裕太;
末崎 圭恵; 中岡 貴義; 入江 さつき; 丸山 徹; 渡邊 博志

ローマ字氏名： Watanabe, Yasuyoshi; Cui Yilong; Doi, Hisashi; Hosoya, Takamitsu; Niwa,
Takashi; Uetake, Yuta; Suezaki, Yoshie; Nakaoka, Takayoshi; Irie, Satsuki;
Maruyama, Toru; Watanabe, Hiroshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。