

機関番号：14101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590143
 研究課題名（和文） 腎特異的酸化ストレスによる尿細管薬物トランスポータの発現・機能変動とその役割
 研究課題名（英文） Expression and functions of drug transporters in renal tubules by kidney-specific oxidative stress and its role
 研究代表者
 奥田 真弘 (OKUDA MASAHIRO)
 三重大学・医学部附属病院・教授
 研究者番号：70252426

研究成果の概要（和文）：(200字程度)

有機カチオン輸送系を保持する培養腎上皮細胞 LLC-PK₁ 細胞及び肝虚血再灌流ラットを用い、酸化ストレスが尿細管有機カチオントランスポータの機能・発現に及ぼす影響を検討した。側底膜を介したカチオン性薬物の細胞内への移行は、酸化ストレスの直接的又は間接的作用により低下し、その要因として有機カチオントランスポータ OCT2 の発現低下が示唆された。本研究成果は、酸化ストレスによる臓器障害時におけるカチオン性薬物の腎排泄クリアランスの変動解析に有用な基礎的知見と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Effect of oxidative stress on the expression and function of organic cation transporters were studied using cultured renal epithelial cell line, LLC-PK₁, which retains organic cation transporters, and rats subjected to liver ischemia-reperfusion. Influx of cationic drugs across basolateral membranes into renal epithelial cells were decreased by oxidative stress by direct or indirect effect, and the involvement of decreased expression of organic cation transporter, OCT2, was suggested. These results provide useful information for analysis of renal clearance of cationic drugs in occasions of organ dysfunction accompanying oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医療薬学・薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード： LLC-PK₁、テトラエチルアンモニウム、高グルコース、Trolox、OCT2、虚血再灌流障害、シメチジン、腎分泌クリアランス

1. 研究開始当初の背景

腎臓は肝臓と並び、生体に投与された薬物の主たる消失経路であり、薬物体内動態の個人差を生じる主要因の一つである。肝臓や腎臓などの細胞膜に発現する薬物トランスポータは血漿中薬物濃度を規定するだけでな

く、しばしば臓器への薬物蓄積を促し臓器障害の発現因子となる。近年、分子生物学的解析が進化した結果、腎近位尿細管上皮細胞の側底膜には有機カチオントランスポータ 2 (OCT2, SLC22A2) が発現し、カチオン性薬物の血液から組織中への取り込み過程を担

い、刷子縁膜では H⁺/有機カチオンアンチポータ 1 (MATE1, SLC47A1) が組織中から管腔中への排泄を媒介することが明らかにされた。また、種々の病態において、カチオン性薬物の尿中排泄が変動することが見出され、これらのトランスポータの機能・発現変動との関連が示唆されてきた。

酸化ストレスは NADPH oxidase や NO synthase (NOS) など種々の要因によって生体内で生成される活性酸素種や活性窒素種によって媒介され、種々のストレス性疾患による臓器の機能障害と極めて密接な関連がある。腎臓は酸化的障害を受けやすい臓器であり、糸球体腎炎や糖尿病性腎症、高血圧、尿毒症、虚血再灌流障害などの病態や、薬剤性腎障害の発症や進行に酸化ストレスが関与することが報告されている。しかしながら、酸化ストレスが薬物の腎排泄機能に及ぼす影響に関する情報は乏しく、腎尿細管の薬物トランスポータの発現量や活性に及ぼす影響は明らかでなかった。

2. 研究の目的

糖尿病モデル動物を用いた検討において腎尿細管 OCT2 の発現変動が報告されている。しかしながら、糖尿病時におけるカチオン性薬物の尿細管分泌や OCT2 の発現変動には不明な点が多く、糖尿病に伴う酸化ストレス亢進との関連も明らかにされていない。

肝虚血再灌流 (I/R) 障害は、肝臓への血流を遮断、再灌流する際に生じ、肝移植時には避けられない問題である。肝 I/R 障害時には、肝臓の機能低下のみならず遠隔臓器である腎臓にも影響を及ぼすことが知られている。しかしながら、肝 I/R 障害が腎臓の有機カチオントランスポータの機能や発現量に及ぼす影響については明らかでない。

本研究では、酸化ストレスが薬物体内動態に及ぼす影響を尿細管薬物輸送並びに薬物トランスポータの発現量・活性に及ぼす酸化ストレスの影響を解析するため、まず、腎尿細管上皮細胞の有機カチオン輸送に及ぼす酸化ストレスの直接的な影響を評価するため、近位尿細管上皮細胞の性質を保持しているブタ腎由来の培養上皮細胞 LLC-PK₁ における有機カチオン輸送、及び OCT2 発現量に対する高グルコース処理の影響、並びにこれらと酸化ストレスとの関連について解析を行った。また、肝 I/R 障害モデルラットを用い、酸化ストレスがカチオン性薬物の腎排泄動態、並びに有機カチオントランスポータの発現・機能変動に及ぼす影響について詳細な解析を加えた。

3. 研究の方法

試薬・材料

L-buthionine sulfoximine (BSO) 及び

N-acetyl-L-cysteine (NAC) は Sigma 社のもの、 α -tocopherol の誘導体である Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetra-methylchroman-2- carboxylic acid) は Calbiochem 社のもの、[¹⁴C]tetraethyl-ammonium (テトラエチルアンモニウム, TEA) 及び [³H] Mannitol は American Radiolabeled Chemicals 社のもの、cimetidine (シメチジン) は Nacalai Tesque 社のもの、その他の試薬は市販特級品を用いた。

細胞培養への薬液曝露

多孔性フィルター (Transwell® 3414, Coster 社) 上に単層培養した LLC-PK₁ 細胞 (ATCC CRL-1392) を 50 μ M BSO に 24 時間曝露後、引き続き 50 μ M BSO の存在下、種々の濃度の D-グルコース (5.5 mM : NG, 25 mM : HG25, 40 mM : HG40) とともに 72 時間培養した。抗酸化剤を用いた検討では、LLC-PK₁ 細胞を 50 μ M BSO の存在下、抗酸化剤 (2.5 mM NAC または 600 μ M Trolox) とともに 24 時間培養し、引き続き 50 μ M BSO および NAC, Trolox の存在下、種々の濃度の D-グルコース (NG, HG40) で 72 時間処理した。薬物輸送活性は、5 μ M [¹⁴C] TEA) 及び 5 μ M [³H] Mannitol を側底膜側チャンバーに加え、60 分間インキュベート後の細胞内蓄積量を測定した。[¹⁴C] TEA 細胞内蓄積量は、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、組織外液中の残存量を [³H] Mannitol で補正することにより評価した。pOCT2 mRNA の発現量はリアルタイム PCR 法を用いて定量した (Forward : 5' - AAGCTCTGCTCTTGCTCAC -3' (547-566) 、Reverse : 5' - ATCAAGCGAAAG-ACGAGCAT -3' (644-625))。

肝虚血再灌流ラットの作製

9 週齢の Wistar 系雄性ラットを用い、左葉及び中葉への血流を 60 分間遮断し再灌流することにより 70 %肝虚血再灌流 (ischemia-reperfusion, I/R) 障害モデルを作製し、血流遮断以外は同様の処置を加えたラットを Sham ラットとした。肝機能は血漿中アルカリホスファターゼ (ALT) 活性を、腎機能は血漿クレアチニン値及び尿素窒素 (BUN) を測定することにより評価した。

シメチジンの全身クリアランス及び腎クリアランス実験

In vivo 全身クリアランス実験は、再灌流 12 時間後に、右大腿静脈よりシメチジン (8 mg/kg) を瞬時投与した後、経時的に採血を行った。In vivo 腎クリアランス実験は、再灌流 12 時間後にシメチジンを負荷投与後、維持量を持続投与することで定常状態とした後、大腿動脈及び膀胱からそれぞれ採血、採尿を行い、腎クリアランスを算出した。また、糸球体濾過速度はイヌリンの腎クリアランスより算出した。血漿中、尿中及び腎組織内のシメチジン濃度は高速液体クロマトグラ

フィーを用いて測定した。rOCT2、rMATE1の蛋白発現量の変動は、抗ペプチド抗体を用いたウェスタンブロット法により評価した。Trolox (2.5 mg/kg) は、再灌流5分前に頸静脈より瞬時投与した。

4. 研究成果

LLC-PK₁ 細胞の TEA 輸送に及ぼす高グルコースの影響： 血中グルコース濃度の正常値に相当する NG、及び高グルコース (HG25, HG40) 下で多孔性フィルター上に培養した LLC-PK₁ 細胞の [¹⁴C] TEA 蓄積量は、頂側膜側 pH 7.4 の条件下では、いずれの濃度の D-グルコースで培養した場合も差が認められなかった。しかし、GSH (還元型グルタチオン) 合成阻害剤である BSO で処理した LLC-PK₁ 細胞では D-グルコース濃度の増加に伴い [¹⁴C] TEA の細胞内蓄積量が増加し、BSO + HG40 群では、BSO + NG 群と比較して 141.4 ± 10.7 % (mean ± SE) に増加していた (図 1)。BSO + HG40 群における [¹⁴C] TEA 蓄積量が BSO + NG 群と比較して増加した原因を解明する目的で、BSO 処理時に NAC を共存させたところ、D-グルコース濃度 (NG, HG40) に関わらず [¹⁴C] TEA 蓄積量は増加し、BSO + HG40 群と同レベルまで上昇した。次に、BSO 処理時に Trolox を共存させたところ、Trolox で処理した細胞では、BSO + HG40 細胞で認められた [¹⁴C] TEA の細胞内蓄積亢進が消失していた。さらに、代表的な脂質過酸化マーカーである malondialdehyde (MDA) の細胞内蓄積量を測定したところ、MDA は HG40 処理した細胞で有意に増加していたが、HG40 + Trolox を併用した細胞では増加が認められず、[¹⁴C] TEA の細胞内蓄積量の変動と対応していた。pOCT2 mRNA 発現量を測定したところ、BSO の

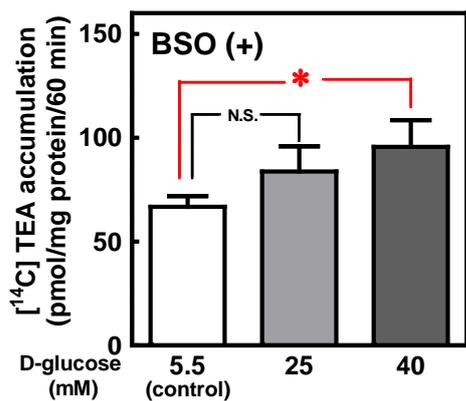


図 1. BSO で前処理し、72 時間種々のグルコース存在下培養した LLC-PK₁ 細胞シートの側底膜を介した [¹⁴C]TEA の取込み。多孔性フィルター上に培養した LLC-PK₁ 細胞シートを 50 μM BSO で 24 時間処理した後、50 μM BSO 及び D-グルコースの存在下、72 時間処理した。細胞の側底膜側チャンバー (pH7.4; 頂側膜側 pH7.4) に 5 μM [¹⁴C] TEA を加え、60 分間インキュベートした。* P < 0.05 vs. control 細胞 (5.5 mM D-グルコース)。Dunnett's 検定による有意差。

存在下にて HG40 で培養した細胞では、NG で培養した細胞に比べ増加する傾向にあったが、Trolox を添加することにより増加傾向は消失していた。

肝虚血再灌流ラットモデルにおけるシメチジンの体内動態変動： 再灌流 12 時間後における I/R モデルラットの血漿中 ALT は約 58 倍に上昇し (P < 0.001)、肝 I/R 障害に伴う肝障害が確認されたが、血漿クレアチニン、BUN には差が認められなかった。I/R モデルラットにおけるシメチジン投与後 2 時間までの血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は、Sham ラットに比べ約 1.3 倍に増加していた (P < 0.001) (表)。一方、全身クリアランスは I/R モデルラットでは Sham ラットの 76 % まで減少し (P < 0.001)、腎クリアランス、腎分泌クリアランスも 74、61 % まで減少していた (各々 P < 0.01, P < 0.01)。

腎粗膜画分中の rOCT2、rMATE1 の蛋白発現量を比較検討した結果、I/R モデルラットにおける rOCT2 及び rMATE1 は Sham ラットのそれぞれ 67% 及び 61% まで減少していた (各々

表. Sham と肝 I/R ラットにおけるシメチジンの体内動態パラメータ

	Sham	I/R
体重 (g)	247 ± 3	257 ± 5
AUC (μg·min/mL)	127 ± 6	168 ± 15***
CLtot (mL/min/kg)	62.9 ± 1.4	48.1 ± 1.8***
Vd (mL/kg)	499 ± 11	462 ± 20
Kel (min ⁻¹)	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01**

数値は 5 匹ラットの平均 ± 標準偏差。AUC: 血中濃度曲線下面積, CLtot: 全身クリアランス, Vd: 中央コンパートメントの分布容積, Kel: 中央コンパートメントからの消失定数。**: p < 0.01, ***: p < 0.001 Sham ラットに対する有意差。

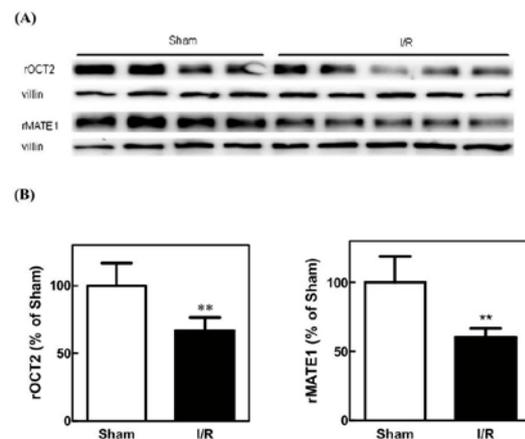


図 2. Sham と肝 I/R ラットの腎粗膜画分における rOCT2 と rMATE1 の発現レベルの比較。(A) 腎由来の粗膜画分を SDS-PAGE で展開。(B) Sham (□) と肝 I/R (■) ラットの rOCT2 及び rMATE1 の光学密度的定量結果を villin で補正した結果。Sham レベルを 100% とした。個々のカラムは sham (n=4) 及び肝 I/R (n=5) ラットの平均 ± 標準偏差。**: p < 0.01 sham ラットに対する有意差。

P<0.01, P<0.01) (図2)。さらに、抗酸化剤である Trolox を再灌流前に投与したところ、肝 I/R 障害後にみられたシメチジンの AUC の増加並びに全身クリアランスの減少は改善し (各々 I/R + vehicle 群と比較し P<0.001, P<0.01)、rOCT2、rMATE1 の蛋白発現量の減少も抑制された。

以上の結果から、高グルコース条件下で培養した LLC-PK₁ 細胞では側底膜を介した有機カチオン輸送が亢進し、その一因として高グルコースによる酸化ストレスの関与が示唆された。また、肝 I/R 障害時におけるシメチジンの全身クリアランスが減少する機構には、腎近位尿細管に発現する rOCT2、rMATE1 を介した腎排泄の低下が関与することが示唆された。さらに、肝 I/R 障害時に生じる酸化ストレスが rOCT2、rMATE1 の発現量と機能低下に関与することが示唆された。本研究結果は、酸化ストレスを伴う疾患時のカチオン性薬物の体内動態変動に解析に有用な基礎的知見と考えられる。

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)

- ① Kurata T, Muraki Y, Mizutani H, Iwamoto T, Okuda M, Elevated systemic elimination of cimetidine in rats with acute biliary obstruction: the role of renal organic cation transporter OCT2. *Drug Metab Pharmacokinet*, **25**: 328-334 (2010) (査読有り)
- ② Mizutani H, Hiraku Y, Tada-Oikawa S, Murata M, Ikemura K, Iwamoto T, Kagawa Y, Okuda M, Kawanishi S, Romidepsin (FK228), a potent histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis through the generation of hydrogen peroxide. *Cancer Sci*, **101**: 2214-2219 (2010) (査読有り)
- ③ Ikemura K, Iwamoto T, Okuda M, Altered functions and expressions of drug transporters in liver, kidney and intestine in disorders of local and remote organs: possible role of oxidative stress in the pathogenesis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **5**: 907-920 (2009) (査読有り)
- ④ Muraki Y, Iwamoto T, Kagawa Y, Sakurai H, Usui M, Isaji S, Uemoto S, Okuda M, The impact of total bilirubin on plasma micafungin levels in living-donor liver transplantation recipients with severe liver dysfunction. *Biol Pharm*

Bull, **32**: 750-754 (2009) (査読有り)

- ⑤ Ikemura K, Urano K, Matsuda H, Mizutani H, Iwamoto T, Okuda M, Decreased oral absorption of cyclosporine A after liver ischemia-reperfusion injury in rats: The contribution of CYP3A and P-glycoprotein to the first-pass metabolism in intestinal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **328**: 249-255 (2009) (査読有り)
- ⑥ Onoda K, Ohashi K, Hashimoto A, Okuda M, Shimono T, Nishikawa M, Shimpo H, Inhibition of platelet aggregation by combined therapy with aspirin and cilostazol after off-pump coronary artery bypass surgery. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, **14**: 230-237 (2008) (査読有り)

[学会発表] (計6件)

- ① Kurata T, Muraki Y, Iwamoto T, Okuda M, Altered function and expression of organic cation transporters, rOCT1 and rOCT2, in acute cholestasis and their implications in the disposition and clearances of drugs. 第4回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (東京都) 2010年11月8日
- ② Kurata T, Muraki Y, Iwamoto T, Okuda M, Pathophysiological role of chenodeoxycholic acid on hepatic disposition of metformin via organic cation transporter 1 in acute cholestasis. JSSX annual meeting 2010 (さいたま市) 2010年10月9日
- ③ 中川恵里加, 倉田朋彦, 池村健治, 岩本卓也, 奥田真弘, 肝虚血再灌流障害時におけるシメチジンの体内動態変動とその要因. 日本薬剤学会第25年会 (徳島市) 2010年5月12日
- ④ 小田都紀子, 松田紘子, 倉田朋彦, 池村健治, 岩本卓也, 奥田真弘, 塩酸イリノテカンとその代謝物の体内動態に及ぼす高尿酸血症の影響. 日本薬学会第130年会 (岡山市) 2010年3月30日
- ⑤ Ikemura K, Mizutani H, Iwamoto T, Okuda M, Role of oxidative stress on decreased intestinal absorption of cyclosporine A by liver ischemia-reperfusion injury in rats. 24th JSSX Annual Meeting in Kyoto (京都市) 2009年11月14日
- ⑥ 池村健治, 浦野公彦, 水谷秀樹, 岩本卓也, 奥田真弘, 肝虚血再灌流障害時の Cyclosporine A の bioavailability 低下における小腸 CYP3A 及び P-糖蛋白質の役割, 日本薬剤学会第23年会 (札幌)

市) 2008年5月22日

[図書] (計1件)

- ① 奥田真弘, 薬物トランスポーター活用ライブラリー 第1章(8) SLC22A1, SLC22A2. pp67-73, 羊土社(東京) 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 真弘 (OKUDA MASAHIRO)
三重大学・医学附属病院・教授
研究者番号: 70252426

(2) 研究分担者

岩本 卓也 (IWAMOTO TAKUYA)
三重大学・医学附属病院・准教授
研究者番号: 30447867

平工 雄介 (HIRAKU YUSUKE)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 30324510