

機関番号：33905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790166

研究課題名（和文）：肝虚血再灌流障害による薬物腎排泄変動とその分子機構の解明

研究課題名（英文）：Molecular analysis of the alteration in renal excretion of drugs by liver ischemia-reperfusion injury

研究代表者

池村 健治 (IKEMURA KENJI)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号：70513935

研究成果の概要（和文）：肝移植後の個別化薬物療法の確立を目指し、肝虚血再灌流(I/R)障害が薬物腎排泄に及ぼす影響について検討した。その結果、肝 I/R 障害後にシメチジンの全身クリアランスが減少し、その機構には、腎近位尿細管に発現する有機カチオントランスポーター 2(rOCT2)、H⁺/有機カチオン逆輸送体 (rMATE1)を介した腎排泄の低下が関与することが示唆された。本研究成果は、肝 I/R 障害時におけるカチオン性薬物の腎排泄低下機構を知る上で有用な知見である。

研究成果の概要（英文）：The effect of liver I/R injury on the renal excretion of drugs was investigated to establish the individual drug therapy after liver transplantation. This study suggested that the systemic clearance of cimetidine was decreased after liver I/R, and that this alternation is attributable to the decreased renal excretion mediated by rOCT2 and rMATE1 in the kidney. The present findings provide useful information for our understanding of renal disposition of cationic drugs in liver I/R injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1020,000	4,420,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：肝虚血再灌流障害、酸化ストレス、薬物トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

肝虚血再灌流(I/R)障害は、臓器が虚血後、血流が再開する際に生じ、術時に産生される酸化ストレス等によって様々な障害を引き起こされ、肝移植時には避けられない問題である。肝 I/R 障害時には肝薬物代謝能が低下

することから肝移植直後の薬物体内動態を変動させる重要な要因であると考えられる。また、肝 I/R 障害時には虚血臓器のみならず他臓器にも障害を引き起こし、なかでも腎臓に及ぼす影響は臨床上大きな問題となっている。一方、肝 I/R 障害をはじめとする酸化

ストレス起因性の疾患時には、種々の薬物トランスポートの機能や発現量の変動が報告されている。しかしながら、肝 I/R 障害後の腎臓における薬物トランスポート変動とその変動機構についてはほとんど情報がない。

2. 研究の目的

肝 I/R 障害後の薬物腎排泄変動とその分子機構を明らかにし、移植時患者に対する個別化薬物療法の確立を目指した臨床薬剤業務の科学的基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肝 I/R 障害モデルラットの作製

Wister 系雄性ラット(9 週齢)を用い、肝臓の左葉及び中葉への血流を 60 分間遮断することにより 70%部分肝虚血を行い、肝 I/R 障害モデルを作製した。肝機能は血漿中 ALT を、腎機能は血漿クレアチニン値及び尿素窒素を測定することにより評価した。

(2) In vivo 全身クリアランス実験

再灌流 12 時間後に、ペントバルビタール(50 mg/ml)麻酔下で、右大腿動脈、右大腿静脈にカニューレを施した。右大腿静脈よりシメチジン(8 mg/kg)を瞬時投与した後、右大腿動脈から経時的に採血を行った。

(3) In vivo 腎クリアランス実験

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ンサ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。

(4) Western Blot 法

In vivo 全身クリアランス実験終了直後に、腎臓を摘出し、腎皮質の粗膜画分を調製した。試料(45 µg)を 10%SDS-PAGE で展開し、PVDF 膜上に転写後、抗 rOCT2 及び rMATE1 ポリクローナル抗体及び抗 Villin 抗体で一晩反応させた。PVDF 膜を洗浄後、HRP 標識した二次抗体を用いた化学発色法によって発光させ、LAS4000 (富士フィルム)を用いてバンドを撮影し、Image J 1.38 を用いて定量化した。内部標準 Villin に対する比を rOCT2 及び rMATE1 発現量とした。

(5) 肝 I/R 障害時に生じる酸化ストレスがシメチジンの体内動態に及ぼす影響の検討

ビタミン E の水溶性誘導体の抗酸化物質である Trolox® (2.5 mg/kg) を再灌流 5 分間に右総頸静脈より瞬時投与し、上記手順と同様の

検討を行い、肝 I/R 障害による酸化ストレスがシメチジンの体内動態及び尿細管トランスポートに及ぼす影響を解析した。

(6) 統計学的解析

データは、平均値±標準偏差で示し、2 群間比較は、unpaired Student's t-test 検定を用い、多群間比較の検定には、Tukey-Kramer 法を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) シメチジンの体内動態並びに尿細管トランスポートに及ぼす肝 I/R 障害の影響

再灌流 12 時間後における I/R 群の血漿中 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。シメチジンを静脈内瞬時投与した場合、Sham 群に比べ、I/R 群では血中濃度(図. 1)及び投与後 2 時間までの血中濃度-時間曲線下面積(AUC)は、有意に増加し ($P < 0.001$)、全身クリアランスは I/R 群では Sham 群の 76 %まで減少し、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 $P < 0.01$, $P < 0.01$)。また、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 群における rOCT2、rMATE1 は共に Sham 群の 67, 61%まで減少していた (図. 2)。以上より、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。

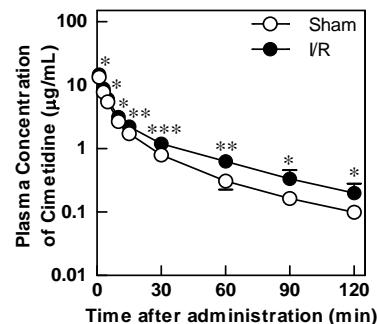


図 1. シメチジン(8 mg/kg)を静脈内瞬時投与後の血漿中シメチジン濃度推移

平均値±標準偏差 (n=5), *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001 vs Sham

(2) 肝 I/R 障害時のシメチジンの体内動態変動における酸化ストレスの役割

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(図. 3, 4)。以上より、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。本研究成果は、肝 I/R 障害時におけるカチオン性薬物の腎排泄低下とその機構を示唆する有用な知見と考えられる。

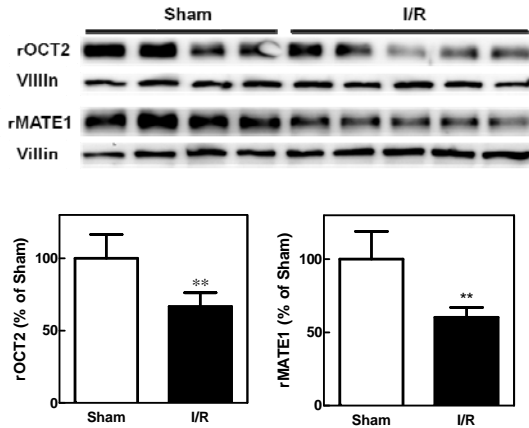


図 2. 腎粗膜画分における rOCT2 及び rMATE1 蛋白発現量の比較

rOCT2 及び rMATE1 蛋白発現量は内部標準の Villin を対象として数値化し、Sham の発現量を 100%として表記した。平均値±標準偏差 (n=4-5), **:p<0.01 vs Sham

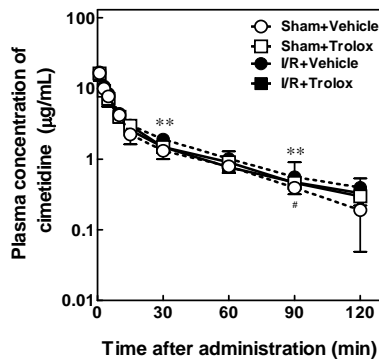


図 3. シメチジン (8 mg/kg) を静脈内瞬時投与後の血漿中シメチジン濃度推移に対する Trolox の効果

平均値±標準偏差 (n=5-6), **: p<0.01 vs Sham+Vehicle rats. #: p<0.05 vs I/R+Vehicle rats.

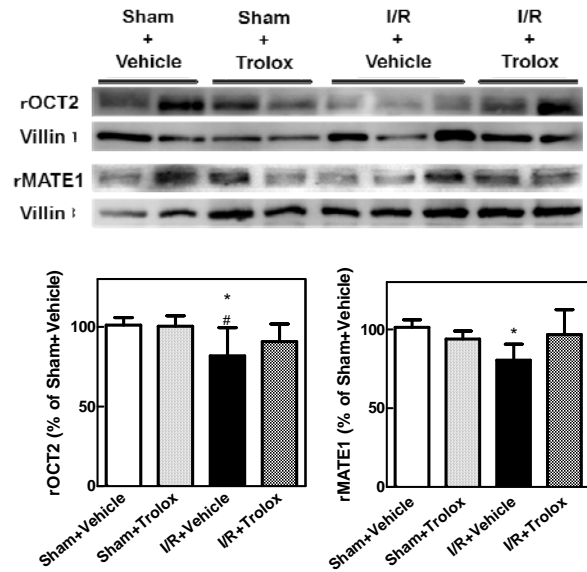


図 4. 腎粗膜画分における rOCT2 及び rMATE1 蛋白発現量に対する Trolox の効果

rOCT2 及び rMATE1 蛋白発現量は内部標準の Villin を対象として数値化し、Sham の発現量を 100%として表記した。平均値±標準偏差 (n=4-5), *: p<0.05 vs Sham+Vehicle rats. #: p<0.05 vs I/R+Vehicle rats.

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 2 件)

① Mizutani H, Ikemura K, Kawanishi S. (他 6 名、5 番目) Romidepsin (FK228), a potent histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis through the generation of hydrogen peroxide. *Cancer Sci*, 101:2214-2223 (2010), 査読有.

② 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

[学会発表] (計 5 件)

① 水谷秀樹、マイトマイシン C による過酸化水素を介したアポトーシス誘導機構、日本薬学会第 131 回年会、2011 年 3 月 29 日~3 月 31 日、静岡コンベンションアーツセンター (静岡県)

② 水谷秀樹、ヒストン脱アセチル化阻害薬ロ

ミデプシンの過酸化水素を介したアポトーシス誘導機構、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日～24 日、大阪国際会議場(大阪府)

③中川恵里加、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 回年会、2010 年 5 月 12 日～14 日、あわぎんホール 徳島県郷土文化会館(徳島県)

④小田都紀子、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 回年会、2010 年 3 月 28 日～30 日、岡山コンベンションセンター(岡山県)

⑤池村健治、肝虚血再灌流障害ラットにおける Cyclosporine A の小腸吸収低下に及ぼす酸化ストレスの影響、日本薬物動態学会第 24 回年会、2009 年 10 月 7 日～9 日、国立京都国際会館(京都府)

[図書] (計 1 件)

①川西正祐、大井一弥、中瀬一則、水谷秀樹、池村健治、他、南山堂、腫瘍薬学、2010、573(P142-150)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池村 健治 (IKEMURA KENJI)
金城学院大学・薬学部・助教
研究者番号：70513935

(2) 研究分担者

該当なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし