

# 東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	腎尿細管の管腔側に局在するH <sup>+</sup> /モノカルボン酸共輸送担体の機能解析
作成者（著者）	滝口, 貴晴
公開者	東邦大学
発行日	2024.03.13
掲載情報	東邦大学大学院薬学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 田中, 光/
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第1110号
学位記番号	甲第141号
学位授与年月日	2024.03.13
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	<a href="https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28225119">https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28225119</a>

## 腎尿細管の管腔側に局在する H<sup>+</sup>/モノカルボン酸共輸送担体の機能解析

所 属：医薬品評価学  
氏 名：滝口 貴晴 印

### 【序論】

腎臓は、体液の電解質濃度や浸透圧、体液量を調整し、代謝の終末産物など不要な物質や有害な物質を排泄することで、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。不要な物質や有害な物質、医薬品は、ネフロンにおける糸球体ろ過と尿細管分泌により、効率よく循環血中から尿細管へと排出される。一般的に、血漿タンパク結合率の低い化合物や医薬品は糸球体ろ過、タンパク結合率の高いものは尿細管分泌の過程を経る。尿細管へと排出された化合物や医薬品の一部は、尿細管の再吸収過程を経て、循環血中へ戻される。分泌や再吸収の過程では、近位尿細管の循環血側と管腔側に発現した、様々な輸送担体が関与している。

循環血中から尿細管上皮細胞内への取り込みには、有機アニオンを基質とする organic anion transporter (OAT1-3)、organic anion transporting polypeptide (OATP4C1)や有機カチオン化合物を基質とする organic cation transporter (OCT1-3) が関与している。尿細管上皮細胞から管腔への排出には、multidrug resistance protein (MDR1)、multidrug resistance-associated protein (MRP2, 4)や breast cancer resistance protein (BCRP)、multidrug and toxin extrusion (MATE1, 2) が関与している。再吸収過程には、OAT4、sodium-coupled monocarboxylate transporter (SMCT1)や urate transporter (URAT1) の関与が示唆されている。

腎臓は内因性及び外因性の化合物を輸送担体を介して効率よく尿中に排泄する役割を担っており、有害物質や医薬品に暴露されている。非ステロイド性消炎鎮痛剤 (NSAIDs) などの医薬品や一部の尿毒素、フェノキシ酢酸系除草剤といった有機アニオンは、多量の暴露により腎障害を引き起こすことが知られている。これら化合物の腎臓での蓄積のメカニズムとして、分泌過程の循環血側から尿細管腔側へのベクトル輸送による一過的な濃縮が示唆されている。さらに、再吸収を受ける場合は、協奏的に尿細管上皮細胞内への濃縮を増大させることが考えられる (図 1)。

そこで、本研究では fluorescein (FLS)を有機アニオンモデル化合物として用い、ヒト近位尿

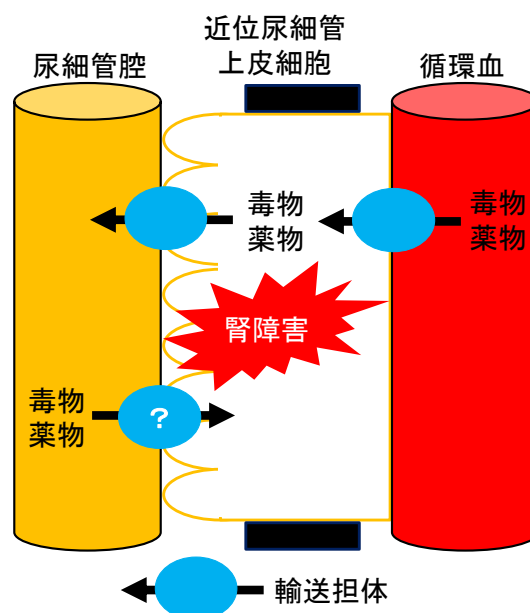


図 1 尿細管における分泌と再吸収による協奏的な毒物・薬物の濃縮を介した腎毒性惹起の機序

細管上皮細胞 (human kidney epithelia (HK-2))における輸送機構を検討した。HK-2 細胞はヒトの近位尿細管上皮由来の細胞株であり、膜の極性 (血液側膜および尿細管側膜) を機能保持している不死化細胞である。これまで、HK-2 細胞は栄養素や医薬品の分泌方向および再吸収方向の各ベクトル輸送の評価に用いられている。また、モデル化合物 FLS は、有機アニオン輸送担体のプローブとして用いられ、単離尿細管を用いた実験により、FLS は近位尿細管上皮細胞に濃縮することが明らかにされている。本研究において、尿細管における生理的な pH 5.8 において効率良く輸送する、pH 依存性モノカルボン酸輸送機構を機能同定したので以下に報告する。

## 【結果および考察】

### 1 HK-2 細胞における pH 依存的な FLS の取り込み

#### 1.1 HK-2 細胞における FLS 輸送の pH 依存性

37 °C、pH を 5.5、6.5、7.5 に設定した条件下で、HK-2 細胞における 10 μM FLS の 1、3、5、10 分間の取り込み量の経時変化を測定した。その結果、FLS の取り込みは 5 分間まで線形性を示し、取り込み条件下の pH の上昇と共に、取り込み量は減少した。pH7.5 に対する pH5.5 の取り込み量の比は、100 倍以上であった。また、protonophore の一つである carbonyl cyanide p-trichloromethoxyphenylhydrazone (CCCP) を 40 μM 添加した条件下では、FLS の取り込み量は約 25 %に低下した。これらの結果から、HK-2 細胞における FLS の取り込みは、プロトンと共輸送であると示された。

#### 1.2 pH 依存的な FLS 輸送系の速度論的解析

37 °C、pH を 5.5、6.0、6.5 に設定した条件下で、HK-2 細胞における FLS の取り込み速度と濃度依存的変化を解析した。その結果、500 μM 以上の高濃度域で飽和性を示し、Michaelis–Menten 型のグラフとなり、Eadie-Hofstee プロットは 1 相の線形性を示した。これらの結果から、この FLS

の取り込みは輸送担体を介したものであると示された (図 2)。取り込み条件下の pH 上昇と共に、最大速度  $V_{max}$  は低下し、Michaelis 定数  $K_m$  は上昇した。各パラメーターの変化は、取り込み条件下のプロトンの電気化学ポテンシャルの違いだけでなく、pH 依存的な輸送担体の結合部位の構造変化による親和性の低下による可能性が示唆された。

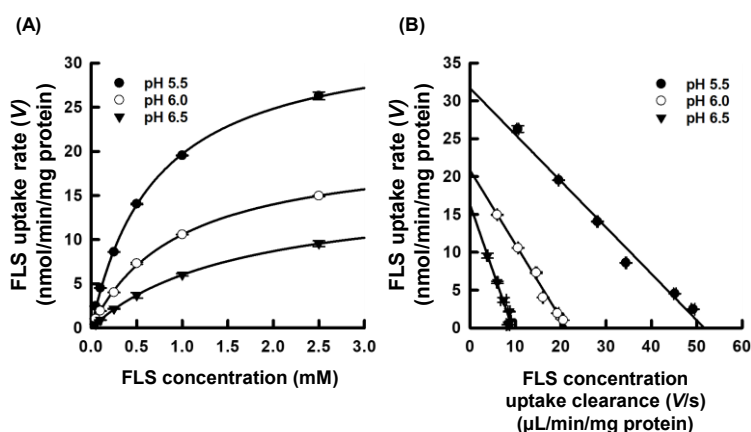


図 2 HK-2 細胞における FLS の濃度依存的な取り込み

## 2 HK-2 細胞における pH 依存的な FLS 輸送の基質特異性<sup>1)</sup>

HK-2 細胞における FLS 輸送系の、基質特異性を明らかにするために、OAT や OATP、モノカルボン酸輸送担体 (MCT)、ペプチド輸送担体 (PEPT) の主な基質・阻害剤による阻害を評価した。その結果、典型的な OAT、OATP の基質や阻害剤による阻害を受けず、モノカルボン酸化合物による阻害を受けた。この取り込みにおける阻害剤について FLS preload 後の HK-2 細胞からの FLS efflux に及ぼす影響を検討した結果、*trans*-stimulation 効果が見られたことから、本輸送担体の基質であることが明らかになった。

### 2.1 FLS 輸送に対する有機アニオン輸送担体の基質による阻害

HK-2 細胞における FLS の取り込みに対する、OAT や OATP、MCT、PEPT の主な阻害剤や基質による取り込みの阻害を評価した。その結果、furosemide、p-アミノ馬尿酸 (PAH)、estrone sulfate、rifampicin といった典型的な OAT や OATP の基質や阻害剤による阻害を受けなかった。一方で、モノカルボン酸化合物の  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHC) や 2,4-dichloro phenoxyacetic acid (2,4-D)、febuxostat、salicylate や diclofenac、ibuprofen といった NSAIDs、尿毒素である indole 3-acetic acid (IAA) は、取り込みを阻害した (図 3)。2,4-D、IAA、ibuprofen、febuxostat の各化合物の濃度を変化させた存在下で FLS を取り込ませた結果、濃度依存的に FLS の取り込みは低下した。

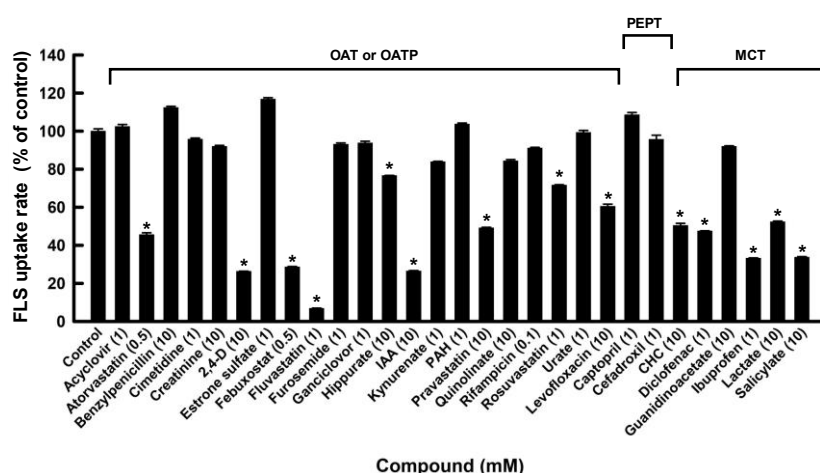


図3 HK-2 細胞における FLS 輸送の基質特異性

37°C、pH 5.5 下で 5 分間、10  $\mu$ M FLS を各基質、阻害剤の存在下と非存在下で取り込ませた。輸送速度を 5 分間までの取り込み量により算出した。

\* $p < 0.01$

### 2.2 取り込みに対する阻害剤と FLS の輸送系との共有性

輸送担体の基質を細胞へ preload した状態の細胞に評価したい化合物に暴露することにより起こる基質輸送の促進効果を *trans*-stimulation 効果とよぶ。評価したい化合物が輸送担体を介して取り込まれる場合に輸送担体が活性化され、preload した基質の排出速度の促進が観察される。図 3 に示す基質特異性の実験により、FLS の取り込み阻害を示すモノカルボン酸化合物、2,4-D、IAA、ibuprofen、febuxostat を用いて、HK-2 細胞からの FLS の efflux 実験を行い、*trans*-stimulation 効果が観察された。この結果から、2,4-D、IAA、ibuprofen、febuxostat は、FLS の輸送系と共有することが明らかになった。

### 3 HK-2細胞におけるpH依存的なFLS輸送系への既知のMCTとOATの関与<sup>1)</sup>

FLSの取り込みを介する輸送担体を明らかにするため、HK-2細胞から抽出したtotal RNAを用いてRT-PCR法で、モノカルボン酸化合物を基質とすることが知られているOAT1-4、10、MCT1-4の発現の有無を評価した。その結果、MCT1, 2, 4の発現が確認された(図4)。この結果を基に、MCT1/2の特異的阻害剤であるAR-C155858、MCT4の特異的阻害剤であるVB124を用いて、HK-2細胞におけるFLS、MCTの基質であるlactateの輸送を評価した。MCT1/2輸送活性に対するIC<sub>50</sub>値より高い100 nM AR-C155858の存在下で、FLSの取り込みは阻害を受けず、lactateは部分的な阻害を受けた。HK-2細胞において発現しているMCT1/2がlactateの取り込みに一部寄与していることが示唆された。IC<sub>50</sub>値より高い100 nM VB124存在下で、FLSとlactateの取り込みは、阻害を受けなかった。以上の結果から、MCT1、2、4は、HK-2細胞におけるpH依存性FLSの輸送系に関与しないことが示唆された。

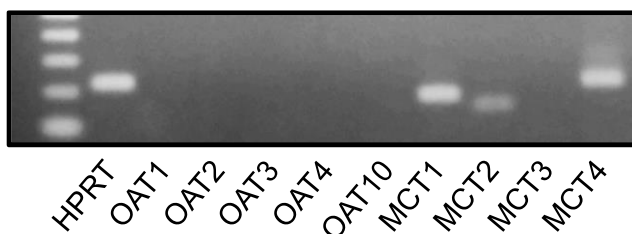


図4 HK-2細胞におけるMCT、OATの発現

HK-2細胞におけるOAT、MCTのmRNAの発現をRT-PCR法で評価した。

HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

#### 【総括】

近位尿細管上皮由来の細胞株であるHK-2細胞において、FLSをモデル基質としてアニオン化合物の輸送を検討した。その結果、輸送担体を介したpH依存的なモノカルボン酸化合物の輸送機構が明らかになった。このFLSの輸送は、既知のOATやOATPの基質・阻害剤、MCT1/2と4の特異的阻害剤による阻害を受けず、既知の有機アニオン輸送系とは異なるものであった。以上の結果は、モノカルボン酸化合物の再吸収機構を解明する新たな手掛かりである。これまでの研究の主流は、分泌機構に着目した研究であった。今回機能同定した、薬物の再吸収方向におけるH<sup>+</sup>/モノカルボン酸共輸送担体は、モノカルボン酸化合物の腎尿細管への濃縮に深く関わることを示唆された。今後、機能の未知なOATやOATPファミリーに属する輸送担体を介したFLSの輸送活性や基質特異性を検証し、本輸送担体の分子同定を行っていく。

#### 【対象論文】

- 1) **Takiguchi T**, Sugio K, Masuda M, Sasaki S, Miyauchi S. Uptake of fluorescein via a pH-dependent monocarboxylate transporter by human kidney 2 (HK-2) cells. *Biol. Pharm. Bull.* (in press)

# 学位論文審査報告書

報告書記載：2024年2月15日

学位申請者名	滝口 貴晴
論文題目	腎尿細管の管腔側に局在するH <sup>+</sup> /モノカルボン酸共輸送担体の機能解析
審査委員名	主査 田中 光 副査 伊関 峰生 副査 福島 健
<p>学位論文の審査結果の要旨：</p> <p>腎臓は内因性および外因性の化合物を輸送担体を介して効率よく尿中に排泄する役割を担っている。腎臓は有害物質や医薬品に暴露させていることを意味し、化合物の腎臓への蓄積による腎障害が薬物治療法を構築する上でも大きな問題となる。腎臓障害を伴わない薬物治療法を構築するためには尿細管上皮細胞における再吸収や分泌を担う個別の輸送担体を明らかにし、輸送の制御を通じて細胞内に蓄積する化合物量を軽減することが必須である。</p> <p>本研究では、近位尿細管上皮由来細胞株であるHK-2細胞において、fluoresceinを基質としてアニオン化合物の輸送を検討した。その結果、輸送担体を介したpH依存的なモノカルボン酸化合物の輸送機構が明らかになった。このfluoresceinの輸送は、OATやOATPの基質・阻害剤、MCT1/2と4の特異的阻害剤による阻害を受けず、既知の有機アニオン輸送系とは異なるものであった。以上の結果は、モノカルボン酸化合物の再吸収機構を解明する新たな手がかりである。これまでの研究の主流は分泌機構に着目した研究であったが、今回機能同定した薬物の再吸収方向におけるH<sup>+</sup>/モノカルボン酸共輸送担体は、モノカルボン酸化合物の腎尿細管への濃縮に深く関わることを示された。今後、機能の未知なOATやOATPファミリーに属する輸送体を介したfluoresceinの輸送活性や基質特異性の検証を通じ、本輸送体の分子同定へと繋がることを期待される。</p> <p>本研究は近位尿細管上皮の再吸収機構を分子レベルで理解する上で重要な情報を含んでおり、研究の進展により腎機能保護を伴う薬物治療の構築への貢献が期待される。研究目的は明確であり、その目標に向けた研究計画を論理的に組み立て、適切に実施している。得られた結果は公正に判断され、それに基づいて次なる実験を計画して研究成果を積み重ねてきたことが学位論文から判断される。手法としてはHK-2細胞を用いた精密な薬物動態学的手法を主体とし、それに分子生物学的手法やウサギ腎尿細管を用いた取り込み測定を併用して結論の信頼度を高めている。審査委員との面談においても実験内容や結果の解釈についての説明は丁寧かつ科学的根拠に基づいていた。研究に対する姿勢は好感が持てるものであり、学術的な知識を含め審査委員全員が評価している。</p> <p>滝口貴晴氏の研究成果は腎臓障害の軽減を意識した今後の薬物治療戦略構築に向けた新しい情報と知見を与えうるものである。この学位論文の内容は既に学術論文英文誌に公表されている。以上より、本審査論文は博士（薬学）の学位に十分に値するものと評価する。</p>	