

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構

所属 金沢大学薬学部
研究者 崔 吉道

要旨

有機アニオンの小腸及び腎臓での排出・分泌機構について検討を行い、type I リン酸トランスポーターNPT1 が有機アニオンを腎近位尿細管刷子縁膜において分泌方向に輸送する事、及び p-aminohippuric acid が、小腸では排出指向性でありその透過性には部位差が認められる事を明らかにした。

1. 研究目的

本研究は、有機アニオン系薬物の小腸および腎臓での細胞内動態に関与するトランスポーターの内、特に「排出・分泌」に関与するものの生理的特性を明らかにする。具体的には、既に腎近位尿細管において有機アニオンの分泌に関わっている可能性が示唆されている type I リン酸トランスポーターNPT1 について遺伝子発現細胞を用いた *in vitro* 実験により動態学的にその関与を証明する。また、その知見を基にその実態が明らかになりつつある小腸における有機アニオン系薬物の「排出・分泌」を行うトランスポーターの可能性を培養細胞およびラット小腸細胞を用いて動態学的に探索する。本検討により、「排出」に関わるトランスポーターの基礎構造認識・輸送の分子機構を明確にする。

2. 研究方法

2-1. ヒト NPT1 遺伝子発現細胞を用いた腎近位尿細管での有機アニオンの分泌動態

2-1-1. ヒト NPT1 遺伝子発現細胞の確立

ヒト NPT1 の cDNA は、ヒト腎 poly(A) + RNA (Clontech, Palo Alto, CA, USA) により RT-PCR 法により分離した。配列を確認後、ヒト NPT1 cDNA を pCAGGS ベクターに組み込んだ後、リン酸カルシウム法により HEK293 細胞にトランスフェクションした。

2-1-2. ヒト NPT1 遺伝子発現細胞における有機アニオンの取り込み

トランスフェクション 48 時間後 ^3H p-Aminohippuric acid (PAH), ^3H estradiol-17 β -glucuronide, ^{14}C benzylpenicillin, ^{14}C faropenem の取り込みおよび排出をシリコンレイヤ法により測定した。排出の測定には、薬物を 10 分間取り込ませた後行った。阻害剤としては、probenecid, β -ラクタム抗生物質 (benzylpenicillin, faropenem), salicylate, indomethacin, 2-ketoglutaric acid, succinic acid 等を用いた。

2-2. ヒト大腸がん由来培養細胞 Caco-2 細胞を用いた有機アニオンの動態

有機アニオンのモデルとして ^3H PAH について、トランスウェルを用いて膜透過実験を行った。Apical-to-basolateral (a-to-b), basolateral-to-apical (b-to-a) それぞれの方向の透過を検討するため、薬物を apical または basolateral 側に添加して実験を行った。pH および温度依存性についても検討した。阻害剤としては、genistein, probenecid, leukotrien C₄, glutareate, benzylpenicillin, triiodothyronine (T₃)等を用いた。

2-3. ラット摘出小腸細胞を用いた有機アニオンの動態

ラット小腸細胞を摘出し、十二指腸、空腸、回腸に分けてユッシングチャンバーに装着して膜透過性を検討した。基質としては、腎近位尿細管での知見をもとに PAH を用いた。非標識体を用いて、測定は HPLC で行った。

3. 研究成果

3-1. ヒト NPT1 遺伝子発現 HEK293 細胞を用いた PAH の刷子縁膜排出輸送系の検討

3-1-1. ヒト NPT1 遺伝子の HEK293 細胞における発現の確認

ウエスタンブロッティング法により腎尿細管刷子縁膜蛋白に、ヒト NPT1 が発現している事を確認した。80, 38 kDa にバンドがみられたが、ヒト NPT1 の cDNA は 4672 のアミノ酸によってコードされ、51 Da と考えられる。この差は、glycosylation によると考えられる。

3-1-2. ヒト NPT1 発現 HEK293 細胞を用いた PAH の取り込み

ヒト NPT1 を介した有機アニオン輸送の特徴を知るためにヒト NPT1 発現 HEK293 細胞を用いて ^3H PAH の取り込み実験を行った。Fig.1 に示すようにヒト NPT1 発現させた HEK293 細胞についてのみ ^3H PAH の取り込みには1分間で飽和がみられた。さらに Na^+ 依存性は無く pH 依存性が観察された。また、 ^3H PAH の取り込みは、Michaelis-Menten 型の飽和を示し、 $K_m = 2.66 \pm 1.02 \text{ mM}$, $V_{\text{max}} = 940 \pm \text{pmol/mg protein/130 s}$ でありヒト NPT1 発現 HEK293 細胞は、 ^3H PAH に対して比較的低い親和性しか示さない事がわかった。

3-1-3. 阻害実験

^3H PAH の輸送は、probenecid, β -ラクタム抗生物質 (benzylpenicillin, faropenem), salicylic acid, indomethacin によって強く阻害された。また、アニオン輸送阻害剤の DIDS によっても阻害を受けたが、2-ketoglutaric acid, succinic acid では阻害されなかった。更に、ヒト NPT1 発現 HEK293 細胞での PAH 輸送を阻害した有機アニオン及びその他のアニオン性化合物を基質として輸送実験を行った。その結果、 ^{14}C uric acid, ^{14}C benzylpenicillin, ^{14}C faropenem, ^{14}C estradiol-17 β -glucuronic acid を取り込む事を確認したが、 ^{14}C indomethacin は、輸送しなかった。

3-1-4. ^3H PAH の HEK293 細胞からの排出方向性

^3H PAH の HEK293 細胞からの排出に、PAH, Cl^- , リン酸の影響はみられなかった。細胞内から細胞外への方向性がある事が確認された。

3-2. Caco-2 細胞における PAH の輸送

Caco-2 細胞の単層トランスウェルを用いて、a-to-b 及び b-to-a 方向への ^3H PAH の輸送を検討した。その結果、b-to-a への輸送が ^3H PAH 場合 a-to-b に比べて大きい事がわかった(Fig.2)。蓄積量も $b > a$ であった。それは、細胞間隙への透過の指標である mannitol の透過よりも高く、a-to-b 方向への輸送は、小腸における吸収方向を示すが、この透過は、細胞間隙による透過のみによっていると考えられた。

過剰の PAH の添加により、a-to-b の ^3H PAH の透過速度及び蓄積には、変化はなかった。したがって、トランスポーターが関与する可能性は低いと考えられた。

一方、b-to-a の ^3H PAH の透過速度は 2 mM 以上の PAH で飽和がみられた。また、a 又は b 側の pH を変えても、 ^3H PAH の透過に変化はみられず、

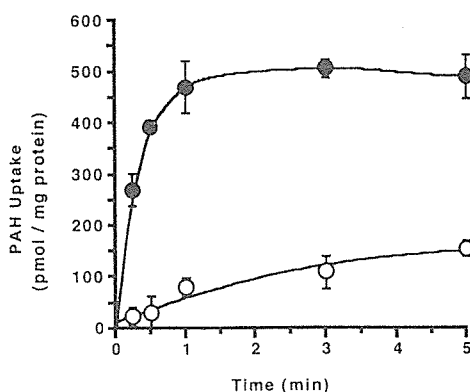


Fig.1. Time course of ^3H PAH uptake in NPT1-expressing HEK293 cells.

At 48 hrs after transfection of HEK293 cells with hNPT1/pCAGGS, the cells were harvested for transport study using the silicon layer method. Uptake of ^3H PAH (100 μM) was measured at the indicated time. The closed and open symbols represent results obtained in HEK293 cells transfected with NPT1/pCAGGS and pcAGGS vector alone, respectively. The results are shown as means \pm S.E.M. of three independent experiments.

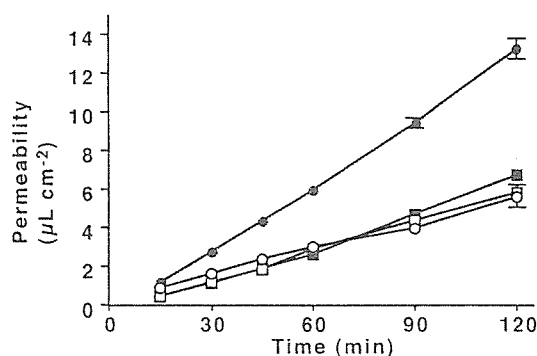


Fig. 2. Permeation of ^3H PAH and ^{14}C mannitol across Caco-2 cell monolayers.

Open and closed symbols represent transport in the apical-to-basolateral and basolateral-to-apical directions, respectively. Circles and squares represent transport of ^3H PAH and ^{14}C mannitol, respectively. The experimental solution was adjusted at pH 7.4 and the temperature was maintained at 37°C. The concentrations of ^3H PAH and ^{14}C mannitol were 0.62 μM and 3.88 μM , respectively. Each point represents the mean \pm S.E. of three experiments.

* $p < 0.05$. Significantly different by Student's t test.

Caco-2 細胞では H⁺の関与は低いと考えられた。温度を 4°C に下げると [³H]PAH の透過は a-to-b、b-to-a 両者とも mannitol の輸送レベルまで低下したが、特にその低下は b-to-a で顕著であった。更に、排出側の特徴を明らかにするために、阻害実験を行った。B-to-a 側の [³H]PAH の透過は、genistein、probenecid 添加により低下した。

3-3. PAH のラット小腸細胞における透過

Caco-2 細胞で観察された現象が、ラット小腸細胞でも観察されるか、ユッシングチャンバーを用いて検討した。

PAH の透過性は、serosa-to-mucosa (s-to-m)、m-to-s とともに部位依存性を示し、十二指腸<空腸<回腸であった(Fig.3)。また、s-to-m > m-to-s であった。これは、排出の輸送系が、小腸の終末部位で高いことが示された。pH 依存性はみられなかったが、温度依存性はみられた。

4. 考察

腎尿細管刷子縁膜側での PAH の排出輸送系については、voltage-sensitive, PAH/anion exchanger, PAH/2-ketoglutarate exchanger が関与する事が知られているが、トランスポーターの分子機構論的解明はなされていなかった。今回我々は、ヒト NPT1 が PAH, uric acid や薬物を含む他の有機アニオンを輸送することを初めて見出した。

今回 PAH の NPT1 による anion exchange メカニズムについては証拠が得られなかったが、Cl⁻感受性はみられた。細胞内から外へは Cl⁻勾配がある事から、PAH の輸送は分泌方向に働いている事が考えられる。

今回の研究でヒト NPT1 は、基質として PAH, probenecid, β-ラクタム抗生物質, salicylic acid を認識することを示した。この基質特異性は、腎尿細管側底膜における有機アニオントランスポーター OAT1 のそれとよく一致している。しかしながら、NPT1 は、刷子縁膜側に局在し、OAT1 は、側底膜側に局在している事から、有機アニオンを OAT1 によって細胞内に取り込み、NPT1 が尿中へ分泌していると考えられる。今回ヒト NPT1 でみられた PAH 取り込みの各薬物による阻害は、ウサギ NaPi-1 ではみられず、マウス Npt1 では観測されている。これは種差と考えられる。

毒性学的には、腎の上皮細胞における排出系は、細胞内に蓄積しないために重要であると考えられる。ヒト NPT1 は type I トランスポーターとしてクローニングされたが、ウサギ NaPi-1 が有機アニオンも一部輸送することがわかってきている。今回 NPT1 が PAH を輸送することを新たに示した。過去に、NPT1 がリン酸を輸送することも明らかにされているが、腎におけるリン酸の吸収には、むしろ type II リン酸トランスポーターの寄与が大きいとされている。よって、NPT1 にはリン酸輸送以外の生理的役割があると推察される。今回の結果は、NPT1 が腎近位尿細管において有機アニオンの排出の役割を担っている可能性を示唆するものである。しかし、依然 NPT1 の in vivo における生理的寄与については不明な点が多い。

最近、いくつかの薬物で、小腸における排出機構が、bioavailability を制限しているという考えが支持されている。Cyclosporin A や verapamil は、小腸にある P-糖蛋白 (P-gp) によって分泌されているという報告がなされている。最近、小腸上で MRP2 が有機アニオンを分泌する事が報告された。アニオン系化合物の小腸における排出については、ほとんど知られておらず、興味深いところである。今回我々は PAH をモデル化合物として選択した。そして、吸収方向より、排出方向に Caco-2 細胞は PAH の輸送活性が高いことを見出した。つまり、小腸においては、PAH の排出系の輸送特性を決定することが重要であると考えられる。また、PAH の Caco-2 細胞上での輸送は、ラットのそれと類似して、排出方向性、pH 及び温度依存性であった。先に示した様に腎尿

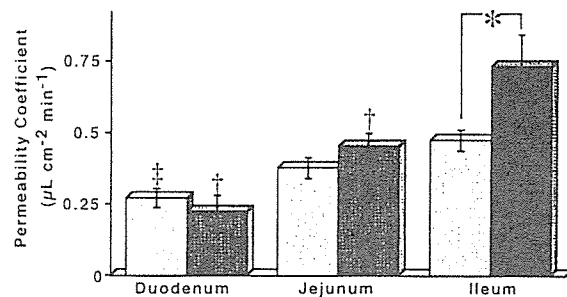


Fig. 3. PAH transport across rat intestinal tissue from various regions.

The transport of PAH (0.1 mM) across the intestinal tissue was evaluated from the time course of the transport by the Ussing chamber method. The tissue was isolated from duodenum, jejunum or ileum. The experimental solution was adjusted at pH 7.4 and the temperature was maintained at 37°C. Dotted and closed columns represent the mucosal-to-serosal and serosal-to-mucosal directions, respectively. Each column represents the mean \pm S.E. of three to six experiments.

* p<0.05. Significantly different between m-to-s and s-to-m transport in the ileum by Student's t test.

†, ‡ p<0.05. Significantly different from m-to-s and s-to-m transport in the ileum, respectively, by Student's t test.

細管において、PAH は、能動的に排出されることが知られている。そのトランスポーターとして側底膜側に OAT1 が報告され、PAH と glutaric acid がカウンタートランスポートされることが知られている。しかし今回 Caco-2 細胞上では、そのような傾向はなかった。

Oatp family が、肝臓で有機アニオン中性物質を運ぶことが知られている。Oatp2/3 の良い基質となる T₃ によって PAH は影響を受けなかった。したがって、OAT1, Oatp2/3 の可能性は低いと考えられた。

小腸に P-gp や MRP2 が発現する事が知られている。P-gp は中性及びカチオン性物質を主に運ぶ。しかし、その代表的阻害剤である cyclosporin A で PAH の輸送は変化しなかった。

MRP2 については、genistein や probenecid が良い阻害剤であり、leukotrien C₄ が良い基質であることが知られている。今回 genistein を作用させたところ、b-to-a 方向の PAH の輸送は低下し、側底膜側での蓄積が増加した。このことは、genistein が側底膜側でなく、刷子縁膜側だけを阻害していると考えられる。

最近、PAH とトランスポーターとしては、OAT だけでなく NPT1 や MRP2 が報告された。NPT1 は腎臓、肝臓に発現すること、MRP2 は肝臓と小腸上皮細胞に発現することが知られている。MRP2 も *in vitro* 実験で PAH を基質として輸送するとの報告がある。Probenecid は、PAH の輸送を減少させたが、蓄積は起こさなかった。したがって probenecid は、側底膜側で作用していると考えられる。しかし、刷子縁膜側の薬物の排出機構は、その分子実体を含めて未だ不明の点が多い。しかし、今回の実験結果より、小腸側底膜側と刷子縁膜側では、違うメカニズムで PAH が排出されていることが示唆された。

5. まとめ

今回我々は、小腸および腎臓において、特に刷子縁膜側での有機アニオンの排出・分泌機構について *in vitro* の実験系により検討を行った。そして、腎尿細管刷子縁膜側の PAH の輸送特性については、NPT1 が、いくつかの有機アニオンを輸送することを新たに示した。これらは、腎臓での薬物蓄積メカニズムを説く一つの鍵となるかもしれない。

一方、小腸においては、腎臓での検討結果を基に PAH を有機アニオンのモデル化合物として選択し、PAH の輸送が小腸では排出指向性であること、そして、この過程は、多くのトランスポーターが、違ったメカニズムで作用していることを示唆した。今回の結果から小腸刷子縁膜側では MRP2 類似のトランスポーターが関与していると考えられた。更に小腸での PAH の排出過程には、部位特異性が見られ十二指腸、空腸、回腸と小腸終末部へ行くほど排出速度が増加した。これらの分泌機構は有機アニオンが小腸で吸収されるときに障壁になると考えられる。

6. 研究発表

- 1) Uchino, H., Tamai, I., Yamashita, K., Miemoto, Y., Sai, Y., Yabuuchi, H., Miyamoto, K., Takeda, E., and Tsuji, A.: p-Aminohippuric acid transport at renal apical membrane mediated by human inorganic phosphate transporter NPT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 254-259 (2000)
- 2) Naruhashi K, Tamai I, Sai Y, Suzuki N, and Tsuji A.
Secretory transport of p-aminohippuric acid across intestinal epithelial cells in Caco-2 cells and isolated intestinal tissue. *J. Pharm. Pharmacol.*, 53, 73-81 (2001)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社