

論文内容要旨

【目的】 腎近位尿細管細胞には多くの薬物トランスポーターが発現し、薬物の腎排泄、特に尿細管分泌および再吸収において重要な役割を担っている。古くからこの輸送システムには分子量 500 以下の比較的的低分子で親水性の高い有機アニオンを輸送する有機アニオン輸送系と有機カチオンを輸送する有機カチオン輸送系が存在し、それぞれ organic anion transporter (OAT) 及び organic cation transporter (OCT) がその分子の実体であることが明らかとされている。一方、腎臓での膜輸送システムにはこれら二つとは異なる輸送系の存在も知られており、それにはジゴキシンや甲状腺ホルモンのようにその構造中に比較的疎水性が高い部位と極性の高い部位を有する化合物が輸送されている。このような新しい輸送系の候補として organic anion transporting polypeptide (OATP) が関与する輸送系が考えられる。

OATP ファミリーは幅広い基質認識性を有し、内因性化合物では胆汁酸や抱合型ステロイド、甲状腺ホルモン、エイコサノイドなどが、外因性化合物ではメトトレキサートやプラバスタチン、ジゴキシンなどといった構造中に比較的疎水性の高い部位と極性の高い部位の両方を有する化合物を基質とする。また、その発現臓器は脳や肝臓、肺など様々な臓器に分布することから OATP ファミリーは薬物の体内動態において重要な役割を担うことが明らかとなってきた。

一方、腎臓においてはラットでは *Oatp1a1/Oatp1* や *Oatp1a3/OAT-K1*, *Oatp1a5/Oatp3* が腎臓に高度に発現することが報告され、*rat Oatp1a1* は近位尿細管の管腔側に発現することで基質化合物の再吸収に関与することが報告されている。しかしながら *Oatp1a1* や *Oatp1a3*, *Oatp1a5* などのヒトでのホモログは依然として単離されていない。またヒト腎臓に発現し、腎排泄において重要な役割を担う OATP も単離、報告されていない。そこで本研究はヒト腎臓に発現する未知 OATP の単離・解析を行うことを目的とした。

【結果・考察】 OATP1B3/ liver-specific organic anion transporter (LST) -2/OATP8 を探索子とした expressed sequence tag (EST) データベースサーチにより、OATP4A1/OATP-E と相同性の高い 411 bp の EST クローン (BF900225) を得た。この配列を基に作製したプライマーを用いて RT-PCR を行い、この EST クローンは腎臓に発現することを確認した。つぎに未知領域の同定を行うため rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法を行った。その結果、OATP4A1 と高い相同性を有する新規クローンが単離されたが、この配列は OATP4A1 との相同性より 5' 端の欠失が予想された。そこでクローニング方法を変更し、ヒト腎臓ファージライブラリーを用いてクローニングを行った。その結果、RACE 法により得られた配列よりも 5' 端に約 180 bp 長いクローンが得られ、この配列は翻訳領域の全長を含むことが明らかとなった。この遺伝子はアミノ酸レベルで OATP6A1/gonad specific transporter (GST) 及び OATP4A1 を始めとする OATP と高い相同性を示し、OATP ファミリーに属する新規遺伝子であった。単離当初は Renal-type の OATP であることから OATP4C1 と命名していたが、HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>) が OATP ファミリーの命名法を整理したことに従い OATP4C1 (Gene symbol; SLCO4C1) と命名した。また、同様にヒトラット腎臓ファージライブラリースクリーニ

ングを行い、rat Oatp4c1 を単離した。

OATP4C1 及び rat Oatp4c1 は共に 724 アミノ酸からなり、アミノ酸配列の解析により 12 回膜貫通型で N 末端及び C 末端は細胞内に位置し、細胞外に 4 個の糖鎖付加部位及び細胞内に 5 個のリン酸化部位を持つと予測された。このような構造は OATP に共通の構造であった。つぎに臓器分布を検討するためノズンプロット解析を行った。その結果、OATP4C1 は腎臓に特異的に発現していることが明らかとなり、OATP4C1 はヒト腎臓に高度に発現する初めての OATP であることが明らかとなった。また、rat Oatp4c1 の臓器分布は OATP4C1 と同様に腎臓に高度に発現しているが、肺や脳にも発現することが明らかとなり臓器分布において種差が認められた。

つぎに機能解析を行うため、イヌ腎上皮由来細胞である Madin Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞を用いて OATP4C1 安定発現細胞株を樹立し、OATP4C1 の機能解析を行った。方法は、細胞をプレートに播種し RI 標識化合物を添加した Krebs-Henseleit (KH) バッファーを各 well に加え、一定時間細胞内に RI 標識化合物を取り込ませた後、細胞内の放射活性を測定することで取込み量を算出した。コントロールとして green fluorescence protein (GFP) を発現させた MDCK 細胞を用いた。まず輸送基質のスクリーニングを行ったところ、甲状腺ホルモン T3 ($K_m = 5.9 \mu\text{M}$) 及び強心配糖体であるジゴキシン ($K_m = 7.8 \mu\text{M}$)、ウアバイン ($K_m = 0.38 \mu\text{M}$) を濃度依存性かつ飽和的に取込んだ。また T4 や cAMP, メトトレキサートもコントロールに比して有意な取込みを示した。このように OATP4C1 は様々な構造を有する化合物を基質とする幅広い基質認識性を有すると考えられた。また取込み阻害実験を行ったところ T3 の取込みをジゴキシンは抑制せずジゴキシンの取込みを T3 は抑制しないという結果が得られた。この結果は T3 とジゴキシンは OATP4C1 の基質であるにも関わらずお互いの輸送に影響を与えないものであり、T3 とジゴキシンは OATP4C1 の異なる部位で認識されていると予想された。このことから OATP4C1 には少なくとも二つ以上の基質認識部位が存在し、このことにより様々な構造を有する化合物を輸送できるものと考えられた。また rat Oatp4c1 においても機能解析を行ったところ OATP4C1 と同程度の親和性で T3 及びジゴキシンを輸送した。Rat Oatp4c1 はアミノ酸レベルの相同性だけではなく機能的にも OATP4C1 のホモログであることが示された。

つぎに OATP4C1/rat Oatp4c1 の腎内発現局在を明らかにするため、マイクロダイセクションにより分離したラット腎臓各部位より RNA を抽出し RT-PCR を行った。その結果、近位尿細管細胞よりバンドが認められ OATP4C1/rat Oatp4c1 は近位尿細管細胞に発現することが明らかとなった。また rat Oatp4c1 に対するポリクローナル抗体を作製し、免疫染色を行ったところ RT-PCR の結果と同様に近位尿細管に発現が確認され、またその発現は血管側であった。以上の結果から OATP4C1/rat Oatp4c1 は近位尿細管の血管側に発現することが明らかとなり、血中の基質化合物を細胞内に取込む機能、つまり尿細管分泌としての機能を有するものと考えられた。

さらに腎不全時の rat Oatp4c1 発現量の変動について解析を行った。腎不全時には腎機能の変化に伴い薬物の腎排泄量が影響を受けることが知られている。その原因の一つに薬物トランスポーターの発現量変動が挙げられる。そこで 5/6 腎摘出ラット及び Wister Kyoto Rat (WKY) - 抗 glomerular basement

membrane (GBM) 腎炎ラットの2種類の腎不全モデルラットを作製し, rat Oatp4c1 の発現量に関する変動を解析した。腎不全モデルラットの腎臓より RNA を抽出し, ノザンブロット解析を行った結果, いずれのモデルにおいても腎不全時には rat Oatp4c1 の発現量が低下することが明らかとなった。そのため腎不全時には OATP4C1 の基質

となる化合物の腎排泄低下が予想される。またこれまでに腎不全時に発現が低下することが報告された OCT2 や Oapt1a1 では, その発現量に性差が知られており, 腎不全時に血中テストステロンが低下することが発現量低下の一因であることが解明されている。しかし ratOatp4c1 の発現量に性差は認められず, 既存のトランスポーターとは異なるメカニズムで発現制御されていると考えられた。

【結論】 以上より OATP4C1 は近位尿細管の血管側に発現する最初の OATP であり, T3 やジゴキシンを始めとする様々な構造を有する化合物を基質とすることで, 薬物の尿細管分泌を担うトランスポーターであると考えられた。例えばジゴキシンにおいては OATP4C1 はジゴキシンの血管側から尿細管細胞内への取込みを担い, 管腔側の MDR1 と協調的に働くことでジゴキシン腎排泄を担うという新たなモデルが想定された。またジゴキシンは腎不全時にその腎排泄が低下するが MDR1 の発現量は変化しないことから, OATP4C1/rat Oatp4c1 の発現量低下がその一因と予想される。

また, これまで尿細管分泌は OAT が担う有機アニオン輸送系と OCT が担う有機カチオン輸送系が知られていたが, 本研究により OATP4C1 が担う新たな輸送系が明らかとなった。OATP4C1 は腎尿細管分泌の新たな輸送システムを担う分子として OATP ファミリーで初めて明らかにされたものであり, 本研究成果は腎排泄型薬物の開発や腎臓をターゲットとした薬物の開発などの創薬への応用や薬物相互作用予測などの臨床応用に発展されていくものであった。

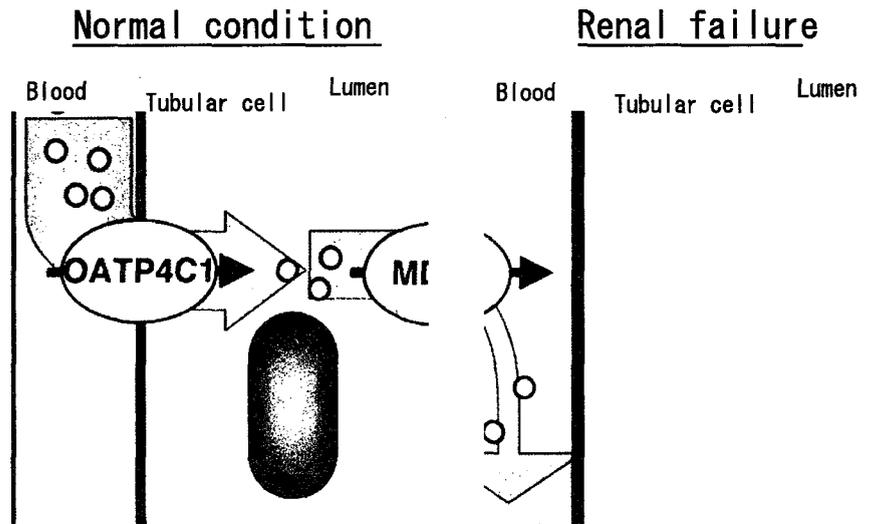


Fig. 1 Proposed mechanism for digoxin renal tubular secretion in normal and renal failure condition.

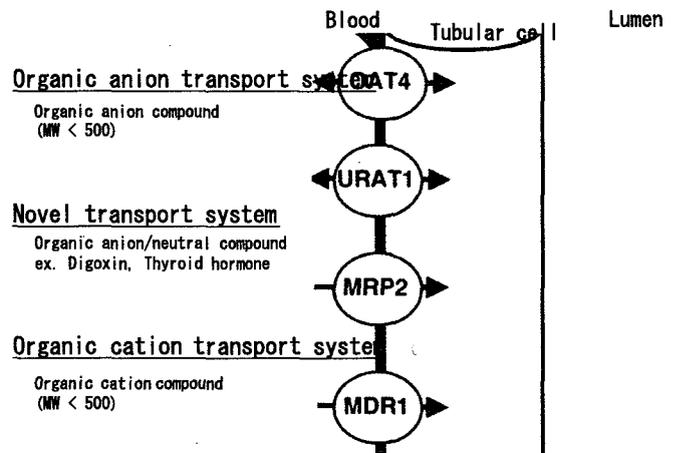


Fig. 2 Schematic diagram of membrane transport system in renal tubular cell.

審査結果の要旨

細胞内外への生理活性物質の輸送に薬物トランスポーターが大きな役割を果たしている。なかでも organic anion transporting polypeptide (OATP) は、内因性物質では抱合型ステロイドホルモン、甲状腺ホルモン、エイコサノイド、胆汁酸など、また外因性化合物ではジゴキシン、メトトレキセートなど幅広い基質に対応し、また脳、肝臓、肺をはじめとした多くの臓器にそのファミリーが発現することから、薬物の体内動態に重要な役割を果たすとされている。腎臓においてはラットで数種の Oatp ファミリーが高度に発現していることが報告されているが、ヒトにおける OATP はいまだその発現が明らかにされていない。こうした観点から、本研究はヒト腎臓に発現する未知 OATP の単離と解析を試みたものである。

先ず、OATP1B3/liver-specific organic anion transporter (LST) -2/OATP8 を探索子として expressed sequence tag (EST) データベースサーチにより OATP4A1/OATP-E と相同性の高い EST クローンを得た。このクローンは、配列を基に作製したプライマーを用いて検討した結果腎臓に発現することが判明した。次いでヒト腎臓ファージライブラリーを用いてクローニングを行い、約 180 bp のクローンを得た。この新規遺伝子は OATP4A1 をはじめとする OATP と高い相同性を示し、OATP4C1 と命名した。尚、ラットからも同様単離し Oatp4c1 と名付けた。

これらとともに 724 のアミノ酸からなり、12 回膜貫通型で、両末端は細胞内に位置し、細胞外に 4 個の糖鎖付加部位を、細胞内に 5 個のリン酸化部位を持ち、他の OATP と共通の構造を持っていた。尚、臓器分布を調べたところ、OATP4C1 は腎臓に特異的に発現していることが判明した。尚、これはヒトの腎臓に発現する OATP としてはじめて発見されたものである。一方、Oatp4c1 は腎臓に高度に発現しているものの、肺、脳にも発現がみられ、臓器分布に種差が認められた。

引き続き、機能解析を行った。その結果、T3、ジゴキシン、ウワバインが良好な基質であった。また、阻害実験から T3 とジゴキシンはお互いの輸送に影響を与えず、それぞれ異なる部位で認識されるものと予想された。次に発現局在に吟味を加えたところ近位尿細管細胞の血管側であることが明かとなった。このことから本トランスポーターは血中の基質を細胞内に取り込む機能を持つものと考えられる。従来、尿細管分泌は OAT と OCT が担う輸送系が知られていたが、本研究により OATP4C1 が担う新たな輸送系の存在が立証された。

以上、本論文は、腎臓のトランスポーター研究に新たな分野を提供したものであり、創薬、さらには薬物相互作用研究に大きなインパクトを与えたものである。よって博士(薬学)の学位論文として合格と認める。