

学 位 論 文 題 名

Organic anion secretion in an animal model  
for Wilson's disease (Long-Evans Cinnamon rats)

(Wilson 病モデル動物 LEC ラットにおける  
有機アニオン排泄能に関する研究)

学位論文内容の要旨

はじめに

Wilson 病は日常生活において摂取される銅が生体内に過剰蓄積し、肝・腎・脳など全身諸臓器の組織傷害をきたす遺伝性銅代謝異常症であり、小児期の慢性肝疾患としては最も頻度が高い病気である。Wilson 病の症状の一つとして低尿酸血症が挙げられる。尿酸は核酸の構成成分であるプリン体の最終代謝産物であり、ヒトでは大部分が尿中に排泄される。腎における尿酸などの有機アニオン輸送に関与する担体の存在は古くから予測されており、p-aminohippuric acid (PAH) を典型的基質として用いて多くの研究がなされてきた。しかしながら、その機能的な重要性が明確であるにもかかわらず、分子の実体については不明な点も多く残っている。Phenolsulfonphthalein (PSP) は腎近位尿管における薬物の分泌機構の存在を証明した最初の薬物であり、臨床において腎機能検査薬として繁用されてきた。一方、PSP と PAH は異なった排泄経路を持つ可能性が示唆されている。薬物トランスポータの研究はこの数年急速な進歩を遂げ、薬物トランスポータが薬物の動態制御に関与する重要な因子であることが明らかにされつつある。本研究ではまず PSP の動態に関与するトランスポータを明らかにすることを目的とした。次いで、Wilson 病モデル動物 LEC ラットにおける有機アニオンの動態を解析した結果、新たな知見が得られたので、これについて報告する。

結果及び考察

1. PSP の輸送機構の解明

腎近位尿管における薬物の排泄は基底膜側からの取り込み、刷子縁膜からの排出という2つの過程を経る。まず基底膜側からの PSP の取り込みに関与するトランスポータについて検討を行った。腎スライスへの PSP の取り込みは濃度飽和性を示し、Eadie-Hofstee plot 解析の結果、2相性を示した。このことから腎基底膜側からの PSP の取り込みには2種のトランスポータが関与していることが明らかとなった。次いで、Oat1 と Oat3 の阻害剤を用いて腎スライスへの PSP の取り込みに対する  $IC_{50}$  値を算出した。その結果、Oat3 の阻害剤がより強い阻害効果を示した。これらの結果より PSP の腎基底膜からの取り込みには Oat3 の寄与が大きいことが明らかとなった。

腎近位尿管刷子縁膜に存在する電位依存的トランスポータは多くのアニオンの排出を担っている。ウサギ・ブタでは PAH と尿酸の輸送は同一あるいは近縁のトランスポータによって行われていると考えられているが、ヒト・ラットでは PAH と尿酸の輸送は異なるトランスポータを介していると考えられている。腎刷子縁膜における PSP の輸送に対する電位依存的なトランスポータの寄与について検討を行った。腎刷子縁膜ベシクルへの PSP の取り込みは内部正の膜電位存在下で促進され、腎刷子縁膜からの PSP の排出に電位依存的トランスポータが関与していることが明らかとなった。続いて電位依存的な PSP の輸送に対する尿酸トランスポータ・PAH トランスポータの寄与を検討した。有機アニオン輸送阻害剤である probenecid、尿酸トランスポータの基質である尿酸・pyrazinoate

は電位依存的な PSP の輸送を阻害した。一方、PAH は電位依存的な PSP の輸送に対し、なんら影響を与えなかった。尿酸による阻害の様式は競合型であった。これらの結果より、腎刷子縁膜からの PSP の排出に電位依存的尿酸トランスポータが関与していることが示された。

細胞内から細胞外へ ATP 依存的に基質を輸送する ATP binding cassette (ABC)トランスポータは多くの臓器に発現し、多剤耐性に関わるトランスポータとして知られている。有機アニオンの輸送に関わる代表的なものに Multidrug resistance-associated protein (Mrp) family が挙げられる。まず、Mrp2 欠損モデルラット EHBR を用いて PSP が Mrp2 の基質となるか否かについて検討した。EHBR における PSP の胆汁排泄クリアランスは SD ラットに比べ、低下しており、PSP が Mrp2 の基質であることが示された。次いで、PSP の尿中排泄に対する ABC トランスポータの寄与について検討した。ABC トランスポータの阻害剤 cyclosporin A (CYA)の共存下で PSP の尿中排泄クリアランスは低下した。しかしながら、Mrp2 は腎刷子縁膜に発現しているが、アニオンの尿中排泄に対する寄与はほとんどないことが報告されている。この結果から、Mrp2 以外の Mrp family が PSP の尿中排泄に関与している可能性が示唆された。

## 2. Wilson 病モデル動物 LEC ラットにおけるアニオン排出機構

Wilson 病は P-type ATPase の異常により銅排出トランスポータの機能が障害され、肝臓や脳に銅が蓄積し、肝・脳障害をきたす疾患である。LEC ラットは北海道大学理学部実験動物センターで確立された純系ラットで、生後 4~5 ヶ月齢で重篤な黄疸と体重減少を主症状とした急性肝炎の自然発症が認められる。LEC ラットでは生後 2 日齢より銅が蓄積し始め、肝炎発症前の 3 ヶ月齢に肝細胞毒性を呈するレベルに達する。LEC ラットはこれらの所見に加え、ヒトと同様 P-type ATPase の異常が観察されることから、Wilson 病のモデル動物とされている。EHBR は Mrp2 機能欠損のため黄疸を発症することが知られている。このことから、LEC ラットにおいても何らかの有機アニオン排泄機能が低下している可能性が考えられる。肝機能検査薬として sulfobromophthalein (BSP)を、腎機能検査薬として PSP を用いて LEC ラットにおけるアニオン排泄能についての検討を行った。その結果、LEC ラットでは BSP の胆汁排泄能のみならず PSP の尿中排泄能が低下していることが明らかとなった。

これまでに報告されている Mrp2 欠損モデルラットはいずれも腎機能は正常であった。LEC ラットはこれらのラットとは異なり、腎におけるアニオン排泄能が低下していた。Wilson 病患者では腎近位尿細管における尿酸の再吸収が低下しているために尿酸排泄が亢進し、低尿酸血症を起こすことが知られている。しかしながら、Wilson 病患者の近位尿細管における有機アニオン排泄に着目して検討を行った報告は無い。糸球体で自由に限外濾過を受ける尿酸とは異なり、PSP はほぼ全量が尿細管より分泌される。これらの点をふまえ、LEC ラット腎近位尿細管における有機アニオン排泄機能について検討を行った。LEC ラット腎スライスへの PSP の取り込みはコントロールである LEA ラットと同様の傾向を示した。この結果より、両ラットで腎近位尿細管基底膜側の輸送機構に差は無いことが明らかとなった。一方、LEC ラット腎刷子縁膜ベシクルへの PSP の取り込みは内部正の膜電位存在下でも促進されなかった。さらに LEC ラット腎刷子縁膜ベシクルへの PAH の取り込みは内部正の膜電位存在下で促進された。これらの結果より、LEC ラットでは尿中への尿酸排泄を抑制するため、腎近位尿細管刷子縁膜に存在する電位依存的尿酸トランスポータの機能が低下している可能性が示唆された。

### まとめ

1. 腎近位尿細基底膜側からの PSP の取り込みには Oat1 及び Oat3 が関与しており、特に Oat3 の寄与が大きいことが明らかとなった。
2. 腎近位尿細管刷子縁膜側からの PSP の排出には電位依存的尿酸トランスポータが関与していることが示唆された。
3. PSP が Mrp2 の基質であることが明らかとなった。また、腎臓における PSP の排出に Mrp family が関与している可能性が示唆された。
4. Wilson 病モデル動物 LEC ラットでは、BSP の胆汁排泄能のみならず PSP の尿中排泄能が低下していることが明らかとなった。

5. LEC ラット腎近位尿細管刷子縁膜において電位依存的尿酸トランスポータの機能が低下している可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 関 健 (臨床薬剤学分野)  
副 査 教 授 宮 崎 勝 巳 (薬物動態解析学分野)  
副 査 助教授 菅 原 満 (薬物動態解析学分野)  
副 査 助教授 宮 内 正 二 (生物物理化学分野)

## 学 位 論 文 題 名

### Organic anion secretion in an animal model for Wilson's disease (Long-Evans Cinnamon rats)

(Wilson 病モデル動物 LEC ラットにおける  
有機アニオン排泄能に関する研究)

本研究では PSP の排泄動態に関与するトランスポータを明らかに、それらの結果から Wilson 病モデル動物 LEC ラットにおける有機アニオンの動態を解析したものである。Wilson 病は日常生活において摂取される銅が生体内に過剰蓄積する遺伝性銅代謝異常症であり、その症状の一つとして低尿酸血症が挙げられる。尿酸はヒトでは大部分が尿中に排泄されるが、腎における尿酸などの有機アニオン輸送に関与する担体の存在は古くから予測されており、p-aminohippuric acid (PAH) を典型的基質として用いて多くの研究がなされてきた。一方、Phenolsulfonphthalein (PSP) は腎近位尿細管における薬物の分泌機構の存在を証明した最初の薬物であり、臨床において腎機能検査薬として繁用されてきた。本研究では、まず基底膜側からの PSP の取り込みに関与するトランスポータ (Oat1、Oat3) について検討を行い、腎基底膜側からの PSP の取り込みにはこれら 2 種のトランスポータが関与していること、PSP の腎基底膜からの取り込みには Oat3 の寄与が大きいことを明らかにした。

一方、腎刷子縁膜における PSP の輸送に対する電位依存的なトランスポータの寄与について検討を行った結果、PSP の取り込みは内部正の膜電位存在下で促進され、腎刷子縁膜からの PSP の排出に電位依存的トランスポータが関与していることを実証している。電位依存的な PSP の輸送に尿酸は競合的阻害効果を示したのに対し PAH はなんら影響を与えなかった。腎近位尿細管刷子縁膜に存在する電位依存的トランスポータは多くのアニオンの排出を担っており、ヒト・ラットでは PAH と尿酸の輸送は異なるトランスポータを介していると考えられている。

このことより腎刷子縁膜からの PSP の排出に電位依存的尿酸トランスポータが関与していることが示された。

次に細胞内から細胞外へ有機アニオンを輸送する代表的な ABC トランスポータである Multidrug resistance-associated protein (Mrp) family の関与を明らかにする目的で、Mrp2 欠損モデルラット EHBR を用いて PSP が Mrp2 の基質となることを示した。しかしなが

ら、Mrp2 は腎刷子縁膜に発現しているが、アニオンの尿中排泄に対する寄与はほとんどないことが報告されている。従って、Mrp2 以外の Mrp family が PSP の尿中排泄に関与している可能性が示唆された。そこで肝機能検査薬として sulfobromophthalein (BSP) を、腎機能検査薬として PSP を用いて LEC ラットにおけるアニオン排泄能についての検討を行った。その結果、LEC ラットでは BSP の胆汁排泄能のみならず PSP の尿中排泄能が低下していることが明らかとなった。すなわち、これまでに報告されている Mrp2 欠損モデルラットとは異なり、LEC ラットは腎におけるアニオン排泄能が低下していることを明らかにした。Wilson 病患者では腎近位尿細管における尿酸の再吸収が低下しているために尿酸排泄が亢進し、低尿酸血症を起こすことが知られている。しかしながら、Wilson 病患者の近位尿細管における有機アニオン排泄に着目して検討を行った報告は無い。これらの点をふまえ、申請者は LEC ラット腎近位尿細管の有機アニオン排泄機能について検討し、LEC ラットとそのコントロールである LEA ラットとで腎近位尿細管基底膜側の輸送機構に差は無いことを実証した。一方、LEC ラット腎刷子縁膜ベシクルを用いて、腎近位尿細管刷子縁膜に存在する電位依存的尿酸トランスポータの機能が低下している可能性を示唆する結果を得ている。

これらの研究成果は、病態生理学的にも臨床薬学の面においても極めて意義あることと認められ、今後の新たな研究への発展が期待されるものである。

審査に当たっては、各審査担当者による持ち回り審査を実施し、各審査員からのコメントを基に申請者に対して主査より諮問並びに論文に対する加筆訂正を求めた。当論文提出者から本論文および関連領域に関する試問に適切な応答が得られ、十分な学力を有することが示された。

以上から、本論文は学位（薬学）に値するものと判断する。