

# 博士論文要旨

---


( 2017 年 2 月 3 日 提出)

## 論文題目

---

急性腎障害ラットにおける組織および赤血球 MRP family の機能解析  
Functional analysis of MRP family in tissue and erythrocyte in acute renal failure rats

---

指導教員 村上 照夫 

---

補助教員 森 信博 


---

大学院

薬学研究科

医療薬学専攻

---

申請者氏名 松島 葵 

---

広島国際大学大学院

学生番号 G13402	氏 名 松島 葵
<p>題 目 急性腎障害ラットにおける赤血球および組織 MRP family の機能解析</p> <p>英文題目 Functional analysis of MRP family in tissue and erythrocyte in acute renal failure rats</p>	
<p>【序論】ATP-binding cassette (ABC) transporter とは、生体防御機構に関わる重要なトランスポーターであり、基質となる化合物を細胞外へと排出し、薬物や内因性物質の細胞内蓄積を防ぐ一二次性（異物排出）能動輸送体である。その中の一つである multidrug resistance-associated protein (MRP) は抱合代謝物など比較的水溶性の高い化合物を基質とし、脳、肝臓、腎臓、消化管、肺、心臓、脾臓、筋肉、赤血球など、全身に分布している。以前の研究で、肝障害時に血中で蓄積する内因性物質が肝臓や腎臓の P-糖タンパク質の機能を阻害することが報告されている。腎障害時には、薬物の体内動態は変動するが、これは腎排泄の遅延だけでなく、分布や代謝なども変動すること、及びその主な機序の一つとして、腎障害時に体内で蓄積する uremic toxins が肝細胞内での代謝を阻害することや、腎基底膜側に発現する organic anion transporter (OAT) などのトランスポーターの発現や機能に影響を及ぼすことなどが報告されている。しかしながら、急性腎障害 (ARF) 時における全身の MRP 機能については報告例もなく、未だ不明な点が多い。</p> <p>本研究では、第 I 章) グリセロール誘発急性腎障害ラットにおける組織および赤血球 MRP 機能の評価、第 II 章) 赤血球 MRP 機能に及ぼす uremic toxins および腎障害ラット血漿成分の影響解析、および第 III 章) シスプラチン誘発急性腎障害ラットにおける MRP の発現と機能解析について検討した。</p> <p>第 I 章 グリセロール誘発急性腎障害ラットにおける組織および赤血球 MRP 機能の評価</p> <p>【方法】グリセロール誘発急性腎障害ラット (Gly-ARF) は 24 時間絶水処置したラットに 50% グリセロール (10 mL/kg) を両下肢部に筋注することで作製した。腎障害の誘発は uremic toxins のひとつである indoxyl sulfate (IS) や blood urea nitrogen (BUN) の血漿中濃度で評価した。各組織および赤血球における MRP 機能は 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (MRP 基質 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione (DNP-SG) の前駆物質) を静注後、または点滴投与時の DNP-SG の細胞内蓄積で評価した (Fig.1)。</p> <p>【結果】グリセロール投与 24 時間後のラット血漿中 IS および BUN 濃度は有意に増加し、腎障害が確認された。Gly-ARF ラットにおいて、CDNB 投与後の肝臓、脾臓、および赤血球内の DNP-SG 濃度は有意に増加した。即ち、これらの組織や赤血球膜に発現している MRP 介在性の排出機能が有意に低下することが示された。さらに、赤血球内濃度と血漿中 IS 濃度間には、有意な相関関係が認められた。</p> <p>第 II 章 赤血球 MRP 機能に及ぼす uremic toxins および腎障害ラット血漿成分の影響解析</p> <p>【方法】いずれの uremic toxins が MRP 阻害作用を有すかについてスクリーニングする目的で、赤血球膜の反転小胞体 (inside-out erythrocyte membrane vesicles, IOV) を作製し、MRP 介在性の DNP-SG 取り込み (赤血球においては排出機能に相当する) に及ぼす uremic toxins や腎障害ラット血漿成分の影響について検討した。また血漿タンパク質の影響を除去できるシステムとして洗浄赤血球を用い、膜透過型の MRP 阻害物質の探索を試みた。</p>	

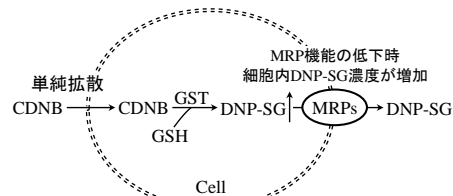


Fig.1 CDNB 代謝後の DNP-SG の排出機構

学生番号 G13402	氏 名 松島 葵
<p>【結果】IOVにおいて、検討した殆どの protein-bond 形 uremic toxins, および Gly-ARF ラットで増加した bilirubin (BIL) によって DNP-SG の取り込みは有意に阻害された. しかしながら、洗浄赤血球においては、IOV で阻害作用を示した kynurenic acid (KYA) の前駆物質である kynurenine (KYN), 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF), および BIL が阻害効果を示した. KYN および KYA の濃度を上げて検討したところ、KYA は IOV でのみ、KYN は洗浄赤血球でのみ阻害効果を示した. これらのことから、Gly-ARF ラット血漿成分にはいくつかの MRP 阻害剤が含まれており、その中でも特に、膜透過型の CMPF と BIL が阻害作用を示すこと、および KYN は、赤血球膜を透過後 KYA に代謝され、その代謝物が赤血球 MRP 機能を阻害する可能性が示された.</p>	
<p>第 III 章 シスプラチン誘発急性腎障害ラットにおける MRP の発現と機能解析</p>	
<p>【方法】シスプラチン (9 mg/kg) を腹腔内に投与し、シスプラチン誘発急性腎障害 (Cis-ARF) ラットを作成した. 各組織の MRP 機能は CDNB を静注後の組織内 DNP-SG の蓄積で評価した (Fig. 1). MRP 発現は Western blot 解析により評価した. また、HepG2 細胞を用いて、calcein-acetoxymethyl ester (calcein-AM) (MRP 基質 calcein の前駆物質) 添加後の細胞内 calcein 蓄積に及ぼす Cis-ARF 血漿成分の影響について検討した.</p>	
<p>【結果】シスプラチン投与 72 時間後、ラット血漿中の IS およびクレアチニン濃度は有意に増加し、腎障害の発症が確認された. この Cis-ARF ラットにおいて、CDNB 投与後の脳、肝臓および腎臓の DNP-SG 濃度は有意に増加した. また、DNP-SG 点滴静注時の肝内濃度で補正した DNP-SG の胆汁クリアランス値も有意に低下した. 脳および肝臓の MRPs 発現量に変化はなく、一方、腎臓の MRPs 量は有意に増加した. これらより、<i>in vivo</i> における機能低下は、MRP の発現量変化に基づくものではなく、血漿中に MRP 阻害物質が蓄積したためと考えられた. HepG2 細胞を用いた検討において、Cis-ARF 血漿成分によって calcein-AM 添加後の細胞内 calcein 蓄積は有意に増加した. これらより、シスプラチン誘発腎障害時において、脳、肝臓、および腎臓の機能が低下すること、及びその低下は発現量の低下によるものではなく、血漿中に MRP 阻害剤が蓄積し、そのためにほぼ全身の MRP 機能が低下する可能性が示された.</p>	
<p>【結論】本研究により以下の知見を得た.</p>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1) グリセロール誘発虚血性腎障害時、肝臓および赤血球の MRP 機能は有意に低下した.</li> <li>2) グリセロール誘発腎障害時の赤血球 MRP 機能の低下は主に膜透過型の CMPF や KYN などの uremic toxins, および溶血に伴う BIL の血漿中濃度上昇が関与していると考えられた.</li> <li>3) シスプラチン誘発腎障害ラットにおいて、肝臓や腎臓、脳の MRP 機能は有意に低下した. ただし、肝や脳の MRP 発現量には有意な変動はなく、腎での発現量は増加した.</li> <li>4) シスプラチン誘発腎障害ラットにおいても、uremic toxins など内因性由来の MRP 阻害物質が血漿内に蓄積し、そのため、ほぼ全身の MRP 機能が低下することが考えられた.</li> </ol>	
<p>本研究により得られた知見は、急性腎障害時には、全身の MRP 機能が変動する可能性があることを示すものであり、MRP 基質を用いた薬物療法において、その投与設計や相互作用の回避などを考察する上で、有用な情報を与えるものと期待される.</p>	