慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	尿細管の両面動態にアプローチする先天性代謝疾患治療法の開拓
Sub Title	Developing the kinetic approach to treat the metabolic disorder from the bilateral side of proximal tubules
Author	野口, 幸希(Noguchi, Saki)
Publisher	
Publication year	2022
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	近位尿細管基底細胞膜に発現する有機アニオントランスポーターOAT1を介したメチルマロン酸の取り込みが示された。また、ラット腎スライスを介したメチルマロン酸取り込みはOAT阻害剤であるプロベネシドによって阻害された。したがって、OAT1は、血中から近位尿細管細胞内への取り込みを介して、メチルマロン酸の尿細管細胞内への蓄積または尿中への分泌機構に関与する可能性が高い。また、ラット尿細管管腔側膜小胞を介したメチルマロン酸の取り込みには、ナトリウム依存性トランスポーターの関与が示唆された。 Of organic anion transporters (OAT) evaluated in this study (OAT1, OAT3, and OAT4), OAT1-mediated transport of methylmalonic acid was indicated. Furthermore, the uptake of methylmalonic acid by rat kidney slice was inhibited by probenecid, an OAT inhibitor. Since OAT1 is responsible for the renal secretion of various drugs by basolateral uptake at the blood facing membrane, OAT1-mediated uptake of methylmalonic acid from the plasma may be involved in the renal toxicity and urinary secretion of methylmalonic acid in methylmalonic acidemia. With respect to methylmalonic acid transport on the luminal side of renal epithelia, sodium ion-dependent uptake of methylmalonic acid by rat renal brush border membrane vesicles was detected. However, overexpression of sodium-dependent dicarboxylate transporter 1 (NaDC1) and sodium-coupled monocarboxylate transporter 2 (SMCT2) had negligible effect on the cellular uptake of methylmalonic acid.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2020～2021 課題番号：20K16056 研究分野：生物薬剤学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20K16056seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　６ 月　５ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：２０Ｋ１６０５６

研究課題名（和文）尿細管の両面動態にアプローチする先天性代謝疾患治療法の開拓

研究課題名（英文）Developing the kinetic approach to treat the metabolic disorder from the bilateral side of proximal tubules

研究代表者
野口　幸希（Noguchi, Saki）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・助教

研究者番号：１０８０３６６１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：近位尿細管基底細胞膜に発現する有機アニオントランスポーターOAT1を介したメチルマロン酸の取り込みが示された。また、ラット腎スライスを介したメチルマロン酸取り込みはOAT阻害剤であるプロベネシドによって阻害された。したがって、OAT1は、血中から近位尿細管細胞内への取り込みを介して、メチルマロン酸の尿細管細胞内への蓄積または尿中への分泌機構に関与する可能性が高い。また、ラット尿細管管腔側膜小胞を介したメチルマロン酸の取り込みには、ナトリウム依存性トランスポーターの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
トランスポーターによるメチルマロン酸の輸送について検討し、OAT1がメチルマロン酸を基質認識することを見出した。メチルマロン酸血症患者における腎障害は近位尿細管で観察されることから、OAT1がメチルマロン酸による腎障害発症に関与している可能性がある。トランスポーターによる有機酸の基質認識は、有機酸代謝異常症における新規薬物治療法を開発したり疾患時の薬物腎クリアランスの変動について予測したりする上で重要な知見となり得る。

研究成果の概要（英文）：Of organic anion transporters (OAT) evaluated in this study (OAT1, OAT3, and OAT4), OAT1-mediated transport of methylmalonic acid was indicated. Furthermore, the uptake of methylmalonic acid by rat kidney slice was inhibited by probenecid, an OAT inhibitor. Since OAT1 is responsible for the renal secretion of various drugs by basolateral uptake at the blood facing membrane, OAT1-mediated uptake of methylmalonic acid from the plasma may be involved in the renal toxicity and urinary secretion of methylmalonic acid in methylmalonic acidemia. With respect to methylmalonic acid transport on the luminal side of renal epithelia, sodium ion-dependent uptake of methylmalonic acid by rat renal brush border membrane vesicles was detected. However, overexpression of sodium-dependent dicarboxylate transporter 1 (NaDC1) and sodium-coupled monocarboxylate transporter 2 (SMCT2) had negligible effect on the cellular uptake of methylmalonic acid.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：トランスポーター　近位尿細管　メチルマロン酸　有機アニオン

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

有機酸代謝異常症は、アミノ酸および脂質の代謝に必要な酵素の活性低下や欠損によって、異常な酸性代謝物が生成・蓄積する先天性の希少疾患である。現在の薬物治療は、有機酸血症を一つの病態と捉え、アミノ酸制限食やカルニチン投与による有機酸排泄促進および二次性カルニチン欠乏の予防を行うことが主である。しかし、十分な効果が示されない例も多い。異常な酸性代謝物は、代謝性アシドーシスおよび高アンモニア血症による発作や様々な全身症状の原因となることから、その体内動態を規定する分子機構を明らかにすることは、薬物治療法の開発に重要である。

有機酸血症患者において、異常酸性代謝物は尿中に排泄される。有機酸代謝異常症の一つであるメチルマロン酸血症において、異常酸性代謝物であるメチルマロン酸の消失機構には、尿細管再吸収過程と分泌過程の両方の存在が示唆される。また、生理的 pH において、メチルマロン酸はアニオンとして存在することから、その尿中排泄機構は担体介在性であると考えられる。さらに、メチルマロン酸は、メチルマロン酸血症患者で観察される、近位尿細管を病巣とする腎障害の原因物質と考えられている。よって、近位尿細管トランスポーターを介した輸送は、メチルマロン酸による腎毒性の発現に関与している可能性がある。しかし、これまでにメチルマロン酸を基質とするトランスポーターは明らかにされていない。

２．研究の目的

本研究では、近位尿細管においてメチルマロン酸を基質とするトランスポーターを明らかにすることを目的として、（１）近位尿細管に発現する有機アニオントランスポーターによるメチルマロン酸の基質認識を明らかにするとともに、（２）ラット腎におけるメチルマロン酸の輸送特性を明らかにするための解析を行った。有機酸代謝異常症の一つであるグルタル酸血症において生成・蓄積されるグルタル酸は、有機アニオントランスポーターOAT1 およびナトリウム/ジカルボン酸共輸送体 NaDC3 を介した尿細管血液側膜からの取り込みと、OAT4 を介した尿細管への排出によって、尿中に分泌されている可能性が示されている(Hagos et al., *Eur J Physiol.* 2008)。メチルマロン酸もジカルボン酸であることから、その輸送においても同様の機構が関与する可能性がある。

３．研究の方法

（１）トランスポーターによるメチルマロン酸の基質認識評価

OAT1、OAT3、OAT4 をテトラサイクリン誘導性に発現する HEK293 細胞株(T-REx OAT1-293, T-REx OAT3-293, T-REx OAT4-293)、NaDC1 を一過性に強制発現させた Cos-7 細胞、およびナトリウム/モノカルボン酸共輸送体 SMCT2 を一過性に強制発現させた HEK293 細胞を用いた。細胞内への[^{14}C]methylmalonic acid、[^{3}H]*p*-aminohippuric acid、[^{3}H]estrone sulfate、[^{3}H]succinic acid、および[^{14}C]lactic acid の取り込み量を、液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

（２）ラット腎スライスおよび腎刷子縁膜小胞を介したメチルマロン酸取り込み実験

尿細管血液側膜および管腔側膜におけるメチルマロン酸の輸送を、それぞれ、腎スライスおよび腎刷子縁膜小胞への取り込みとして評価した。8 週齢オスの SD ラットから腎臓を摘出し、切片を作成した。また、腎髄質を除去し、膜小胞を作成した。小胞の純度および配向性は、刷子縁膜マーカーとして alkaline phosphatase を用い、その活性を評価することで算出した。[^{14}C]Methylmalonic acid、[^{3}H]*p*-aminohippuric acid、および D-[^{3}H]glucose の取り込みは、液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

４．研究成果

（１）OAT1、OAT3、および OAT4 によるメチルマロン酸の基質認識

近位尿細管血液側の基底細胞膜に発現する有機アニオントランスポーターに関して、OAT1 発現誘導細胞では、OAT1 の代表的な基質である *p*-アミノ馬尿酸と同様に、非発現誘導細胞と比較してメチルマロン酸の取り込みが有意に増加し、その取り込みは、取り込み開始 10 分後まで時間依存的に上昇した。したがって、メチルマロン酸がヒト OAT1 の基質となることが示された。一方、OAT3 発現誘導細胞において、OAT3 の代表的な基質であるエストロン硫酸の取り込みは、非発現誘導細胞と比べて有意に増加したものの、メチルマロン酸の取り込みには差が示されなかった。

ヒト近位尿細管管腔側の刷子縁膜に発現する OAT4 は、その基質によって、「細胞内ジカルボン酸との交換輸送による取り込み」および「細胞外塩化物イオンとの交換輸送による排出」のいずれの方向への基質輸送にも関与する(Noguchi et al., *Drug Metab Pharmacokinet.* 2021,

Noguchi et al., *J Pharm Sci*. 2015）。しかし、細胞外塩化物イオンの有無にかかわらず、OAT4を介したメチルマロン酸の輸送は示されなかった。したがって、OAT4 は、メチルマロン酸の分泌および再吸収のいずれの方向の輸送にも関与する可能性が低いことがわかった。

（２）ラット腎スライスへのメチルマロン酸の取り込み

メチルマロン酸を基質認識することが明らかとなった OAT1 は、近位尿細管基底細胞膜に発現する。そこで、ラット腎スライスへのメチルマロン酸の取り込みに対する OAT 阻害剤の効果を検討した。ラット腎スライスを介したメチルマロン酸および *p*-アミノ馬尿酸の取り込みは、時間依存的に増加し、これらの 30 分間の取り込み量は、OAT 阻害剤であるプロベネシドが存在することで有意に低下した。これらより、OAT1 は、メチルマロン酸の血中から近位尿細管細胞内への取り込みを介して、メチルマロン酸の尿細管細胞内への蓄積または尿中への分泌機構に関与する可能性が高いことが示された。メチルマロン酸による腎障害は近位尿細管で観察されることから、OAT1 がメチルマロン酸による腎障害発症に関与している可能性がある。

（３）ラット腎刷子縁膜小胞へのメチルマロン酸取り込み

作成したラット腎膜小胞は、ほぼすべてが生体と同じ配向性を示すと算出され、刷子縁膜マーカーの濃縮とナトリウムイオン依存性の D-glucose 取り込みを示したことから、尿細管刷子縁膜における輸送機能を評価可能であると判断した。ラット腎刷子縁膜小胞へのメチルマロン酸の取り込みは、時間依存的に上昇し、4°Cにおける取り込みは、37°Cにおける取り込みの約 20%であった。小胞へのメチルマロン酸の取り込みは、小胞外液からナトリウムイオンを除くことで、約 30%に減少したことから、尿細管刷子縁膜におけるメチルマロン酸の取り込みには、ナトリウム依存性トランスポーターが関与することが示唆された。また、小胞外液から塩化物イオンを除くことによっては、腎刷子縁膜小胞へのメチルマロン酸取り込みが、わずかではあるものの有意に上昇し、オーバーシュート現象が示された。よって、メチルマロン酸の尿細管刷子縁膜を介した輸送には、一部に塩化物イオンとの交換輸送機構もはたらくことが示唆された。

（４）NaDC1 および SMCT2 によるメチルマロン酸の基質認識

メチルマロン酸のラット尿細管刷子縁膜への取り込みにおいて、特にナトリウム依存性トランスポーターに着目した解析が必要であることが示されたことから、近位尿細管刷子縁膜に発現するナトリウム/ジカルボン酸共輸送体 NaDC1 およびナトリウム/モノカルボン酸共輸送体 SMCT2 の発現ベクターを作成し、それらを導入した過剰発現細胞を用いて、メチルマロン酸の輸送を検討した。NaDC1 発現細胞では、非発現細胞と比べて NaDC1 の代表的な基質であるコハク酸の取り込みが著しく増加した一方で、メチルマロン酸の取り込みにはほとんど差が示されなかった。また、SMCT2 発現細胞においても、非発現細胞と比べて SMCT2 の代表的な基質である乳酸の取り込みが増加した一方、メチルマロン酸の取り込みには差がなかった。よって NaDC1 および SMCT2 がメチルマロン酸の輸送に関与する可能性は低いことが示された。

＜引用文献＞

Hagos Y, Krick W, Braulke T, Mühlhausen C, Burckhardt G, Burckhardt BC: Organic anion transporters OAT1 and OAT4 mediate the high affinity transport of glutarate derivatives accumulating in patients with glutaric acidurias. *Pflugers Arch*. 2008, **457**(1):223-231

Noguchi S, Okochi M, Atsuta H, Kimura R, Fukumoto A. Takahashi K. Nishimura T, Tomi M: Substrate recognition of renally eliminated angiotensin II receptor blockers by organic anion transporter 4. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2021, **36**:100363

Noguchi S, Nishimura T, Fujibayashi A, Maruyama T, Tomi M, Nakashima E: OAT4-mediated transport of olmesartan at basal plasma membrane of human placental barrier. *J Pharm Sci*. 2015, **104**(9):3128-3135.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計8件（うち査読付論文　8件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　4件）

１．著者名 Fokina Valentina M.、Patrikeeva Svetlana、Wang Xiao-ming、Noguchi Saki、Tomi Masatoshi、Konig Jorg、Ahmed Mahmoud S.、Nanovskaya Tatiana	４．巻 111
２．論文標題 Role of Uptake Transporters OAT4, OATP2A1, and OATP1A2 in Human Placental Bio-disposition of Pravastatin	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	６．最初と最後の頁 505～516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2021.09.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

１．著者名 Fujita Arimi、Noguchi Saki、Hamada Rika、Inoue Satoko、Shimada Tsutomu、Katakura Satomi、Maruyama Tetsuo、Sai Yoshimichi、Nishimura Tomohiro、Tomi Masatoshi	４．巻 -
２．論文標題 Limited Impact of Murine Placental MDR1 on Fetal Exposure of Certain Drugs Explained by Bypass Transfer Between Adjacent Syncytiotrophoblast Layers	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Pharmaceutical Research	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11095-022-03165-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Kurosawa Ken、Noguchi Saki、Nishimura Tomohiro、Tomi Masatoshi、Chiba Koji	４．巻 50
２．論文標題 Transplacental Pharmacokinetic Model of Digoxin Based on Ex Vivo Human Placental Perfusion Study	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Drug Metabolism and Disposition	６．最初と最後の頁 287～298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/dmd.121.000648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Inagaki Mai、Nishimura Tomohiro、Nakanishi Takeo、Shimada Hiroaki、Noguchi Saki、Akanuma Shin-ichi、Tachikawa Masanori、Hosoya Ken-ichi、Tamai Ikumi、Nakashima Emi、Tomi Masatoshi	４．巻 23
２．論文標題 Contribution of Prostaglandin Transporter OATP2A1/SLCO2A1 to Placenta-to-Maternal Hormone Signaling and Labor Induction	５．発行年 2020年
３．雑誌名 iScience	６．最初と最後の頁 101098～101098
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Kurosawa Ken、Chiba Koji、Noguchi Saki、Nishimura Tomohiro、Tomi Masatoshi	4．巻 48
2．論文標題 Development of a Pharmacokinetic Model of Transplacental Transfer of Metformin to Predict In Vivo Fetal Exposure	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Drug Metabolism and Disposition	6．最初と最後の頁 1293～1302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/dmd.120.000127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Noguchi Saki、Okochi Moeko、Atsuta Hayumi、Kimura Rika、Fukumoto Ayaka、Takahashi Kyoko、Nishimura Tomohiro、Tomi Masatoshi	4．巻 36
2．論文標題 Substrate recognition of renally eliminated angiotensin II receptor blockers by organic anion transporter 4	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6．最初と最後の頁 100363～100363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2020.10.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Noguchi Saki、Takagi Akinori、Tanaka Takahiro、Takahashi Yu、Pan Xiaole、Kibayashi Yuka、Mizokami Ryo、Nishimura Tomohiro、Tomi Masatoshi	4．巻 42
2．論文標題 Fluorouracil uptake in triple‐negative breast cancer cells: Negligible contribution of equilibrative nucleoside transporters 1 and 2	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Biopharmaceutics & Drug Disposition	6．最初と最後の頁 85～93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bdd.2261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Pan Xiaole、Noguchi Saki、Ando Misuzu、Nishimura Tomohiro、Tomi Masatoshi	4．巻 545
2．論文標題 MicroRNA-126 suppresses the invasion of trophoblast-model JEG-3 cells by targeting LIN28A	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6．最初と最後の頁 132～137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.01.077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計11件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 野口幸希，潘暁楽，安藤美鈴，西村友宏，登美斉俊
2．発表標題 LIN28A発現抑制を介したmiR-126によるJEG-3細胞の浸潤抑制
3．学会等名 第29回日本胎盤学会学術集会
4．発表年 2021年

1．発表者名 中田 柚貴子，野口 幸希，西村 友宏，登美 斉俊
2．発表標題 有機アニオントランスポーターOAT1，3及び4を介したメチルマロン酸輸送の評価
3．学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4．発表年 2021年

1．発表者名 Nakada Y，Noguchi S，Nishimura T，Tomi M
2．発表標題 Evaluation of methylmalonic acid transport via transporters expressed in proximal tubules
3．学会等名 第15回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム
4．発表年 2021年

1．発表者名 深澤 尚美，野口 幸希，西村 友宏，登美 斉俊
2．発表標題 Olmesartanのプロドラッグ化によるOATP2B1認識性獲得
3．学会等名 日本薬剤学会第36年会
4．発表年 2021年

１．発表者名 野口幸希、舟橋和毅、西村友宏、登美斉俊
２．発表標題 OlmesartanのMDCK細胞層透過におけるOAT4介在輸送の方向性評価
３．学会等名 日本薬剤学会第35年会
４．発表年 2020年

１．発表者名 稲垣舞、登美斉俊、中西猛夫、島田紘明、野口幸希、赤沼伸乙、立川正憲、細谷健一、玉井郁巳、中島恵美、西村友宏
２．発表標題 OATP2A1を介した胎盤PGE2代謝制御が分娩誘発に果たす役割
３．学会等名 日本薬剤学会第35年会
４．発表年 2020年

１．発表者名 野口 幸希、高橋 優、西村 友宏、登美 斉俊
２．発表標題 プレガバリンのラット脳移行における血漿中LAT1基質アミノ酸の影響
３．学会等名 第15回トランスポーター研究会年会
４．発表年 2020年

１．発表者名 深澤 尚美、野口 幸希、西村 友宏、登美 斉俊
２．発表標題 エステル修飾型酸性プロドラッグに対するOATP2B1 の輸送能
３．学会等名 第5回トランスポーター研究会関東部会
４．発表年 2020年

１．発表者名 三輪 晴香、野口 幸希、加島 里菜、西村 友宏、登美 斉俊
２．発表標題 OAT1 及びOAT3 を介したアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬輸送の評価
３．学会等名 第5回トランスポーター研究会関東部会
４．発表年 2020年

１．発表者名 中口佳美、西村友宏、市田智久、高橋優、野口幸希、丸山哲夫、石本尚大、加藤将夫、登美斉俊
２．発表標題 胎盤におけるOCTN1の発現とメトホルミン輸送への関与の検討
３．学会等名 第35回日本薬物動態学会年会
４．発表年 2020年

１．発表者名 野口 幸希、潘 暁楽、西村 友宏、登美 斉俊
２．発表標題 miR-126によるLIN28A制御を介した、胎盤栄養膜モデルJEG-3細胞の浸潤抑制
３．学会等名 日本薬学会第141年会
４．発表年 2021年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関