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

Title	有機酸取り込みトランスポーターを標的とした腎不全予防法の提案
Sub Title	Developing prophylaxis of renal failure by targeting organic acid uptake transporters
Author	野口, 幸希(Noguchi, Saki)
Publisher	
Publication year	2024
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	近位尿細管に発現する有機アニオントランスポーターOAT1がメチルマロン酸(MMA)を基質とすることから、有機アニオントランスポーター阻害剤がラットにおけるMMA動態に与える影響を検討したところ、その繰り返し投与によって、ラット腎皮質におけるMMA濃度の低下が示された。また、ラット腎切片へのMMA取り込みは、ナトリウム感受性を示し、ナトリウム・ジカルボン酸共輸送体NaDC3発現細胞におけるMMA取り込みの上昇が示されたことから、MMAは、NaDC3の基質にもなることが示された。 The effect of organic anion transporter (OAT) inhibition on endogenous methylmalonic acid (MMA) disposition was investigated in rats because we have reported that OAT1, a renal basolateral transporter, mediates MMA uptake. The repeated administration of an OAT inhibitor resulted in a decrease in rat renal cortical MMA concentration. Furthermore, the uptake of MMA by rat renal cortical slices exhibited sodium ion sensitivity, and sodium/dicarboxylate co-transporter NaDC3-mediated MMA uptake was detected in the overexpressing cells, indicating that MMA is also a NaDC3 substrate.
Notes	研究種目：研究活動スタート支援 研究期間：2022～2023 課題番号：22K20723 研究分野：生物薬剤学、薬物動態学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22K20723seika

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　６ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2022～2023
課題番号：２２Ｋ２０７２３

研究課題名（和文）有機酸取り込みトランスポーターを標的とした腎不全予防法の提案

研究課題名（英文）Developing prophylaxis of renal failure by targeting organic acid uptake transporters

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）　　2,200,000円

研究成果の概要（和文）：近位尿細管に発現する有機アニオントランスポーターOAT1がメチルマロン酸(MMA)を基質とすることから、有機アニオントランスポーター阻害剤がラットにおけるMMA動態に与える影響を検討したところ、その繰り返し投与によって、ラット腎皮質におけるMMA濃度の低下が示された。また、ラット腎切片へのMMA取り込みは、ナトリウム感受性を示し、ナトリウム・ジカルボン酸共輸送体NaDC3発現細胞におけるMMA取り込みの上昇が示されたことから、MMAは、NaDC3の基質にもなることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
慢性腎不全は、メチルマロン酸(MMA)血症患者に特徴的な長期合併症であり、近位尿細管上皮細胞における病変が観察される。MMAは生体内でアニオンとして存在することから、アニオントランスポーターを介した尿細管上皮細胞へのMMA取り込みは、腎障害を誘発している可能性が高い。本研究では、ラットにおいて、有機アニオントランスポーターの阻害によるMMAの腎蓄積低減効果が示唆された。今後、腎毒性についての慎重な評価が求められるものの、MMA血症における腎障害の新たな予防法を提案できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The effect of organic anion transporter (OAT) inhibition on endogenous methylmalonic acid (MMA) disposition was investigated in rats because we have reported that OAT1, a renal basolateral transporter, mediates MMA uptake. The repeated administration of an OAT inhibitor resulted in a decrease in rat renal cortical MMA concentration. Furthermore, the uptake of MMA by rat renal cortical slices exhibited sodium ion sensitivity, and sodium/dicarboxylate co-transporter NaDC3-mediated MMA uptake was detected in the overexpressing cells, indicating that MMA is also a NaDC3 substrate.

研究分野：生物薬剤学、薬物動態学

キーワード：トランスポーター　有機アニオントランスポーター　近位尿細管　有機酸　メチルマロン酸　腎障害　腎排泄

※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、アミノ酸や脂肪の代謝酵素の欠失や活性低下により、異常な酸性代謝物が産生・蓄積されることによって引き起こされる先天性疾患群である。現在の治療法は、有機酸の産生抑制および排泄促進を目的とした、低アミノ酸食やカルニチン補給が主である。しかし、現行の治療法の有効性は十分とは言えず、これら疾患および疾患関連合併症の根本的な機構についての、さらなる研究が必要である。

メチルマロン酸（methylmalonic acid, MMA）血症は、最も発症例の多い有機酸代謝異常症であり、メチルマロニル-CoA の異常代謝物である MMA の血清中濃度上昇を示す。メチルマロニル CoA をスクシニル CoA に代謝するミトコンドリア酵素であるメチルマロニル CoA ムターゼの欠損、またはその補酵素であるアデノシル-コバラミンの合成異常が本疾患の原因である（図 1）。嘔吐や低血糖、筋緊張低下などの急性症状を通常乳児期から呈し、特徴的かつ重篤な長期合併症として、進行性の慢性腎障害が知られる。

MMA は主に MMA 血症患者の肝臓で産生され、尿中に排泄される。MMA 血症患者の腎障害は、近位尿細管で観察されるが遠位尿細管では観察されず(Zsengellér ZK. *et al., Pediatr Nephrol.* **29**:2139-2146 (2014))、その重症度は血清 MMA 濃度と相関する(Kruszka PS. *et al., Genet Med.* **15**:990-996 (2013))。生体内 pH において、MMA はアニオンとして存在すると推測されることから、トランスポーターを介した近位尿細管上皮への MMA の取り込みは、MMA 血症における腎毒性を引き起こす可能性がある。

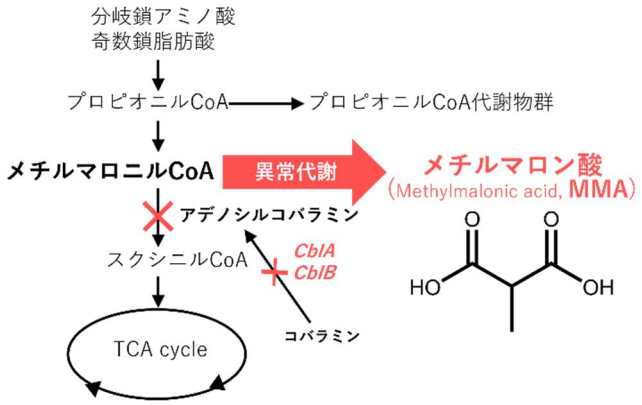

図１　メチルマロン酸産生機構

２．研究の目的

本研究では、メチルマロン酸(MMA)血症における腎障害の予防標的となり得る、MMA 認識トランスポーターを明らかにし、MMA 蓄積に与える影響を評価することを目的とした。慢性腎障害は、有機酸代謝異常症の中でも、MMA 血症に特徴的な合併症である。薬物によって尿細管中 MMA 濃度を低下させることで、腎毒性が予防できれば、移植や透析の回避につながる。しかし、尿細管輸送過程を標的にした有機酸血症治療は行われていない。これまでの研究により、近位尿細管に発現する有機アニオントランスポーターOAT1 (organic anion transporter 1)が MMA を基質認識することを明らかにしていたことから、本研究では、(1) OAT 阻害がラット腎における MMA 蓄積に与える影響を評価した。さらに、(2) 近位尿細管に発現する OAT1 以外の MMA 認識トランスポーターの探索を行った。

３．研究の方法

（１）LC-MS/MS による MMA 濃度測定

ラット生体試料は、内標準物質として d3-MMA を含む acetonitrile で除タンパク処理をし、遠心分離した上清を、冷却トラップを連結した遠心エバポレーターで低気圧条件下脱溶媒した後、0.5% formic acid in methanol で再構成した。分析用カラムには Force C18 (3.0 mm×100 mm, 3 μm, Restek)を 35 °C で使用し、エレクトロスプレーイオン化 negative mode の多重反応モニタリングにて検出した。採血は頸静脈より行い、採尿は代謝ケージによって行った。腎臓は髄質部分を取り除き、腎皮質のみを測定に使用した。

（２）ラットへの OAT 阻害剤投与実験

8 週齢雄性 SD ラットに対して、麻酔下、フィーディングニードルを使用して、OAT 阻害剤を経口投与した。単回経口投与実験では、投与 4 時間後に腎臓を摘出した。繰り返し投与実験では、1 日 2 回(AM10:00, PM6:00)、6 日間、OAT 阻害剤を経口投与し、投与 6 日目に腎臓を摘出した。

（３）MMA 認識トランスポーターの探索

ヒト SLC13A3、ラット Slc13a3、およびラット Slc10a3 cDNA を、pcDNA3 ベクターにサブクローニングし、リポフェクション法によって COS-7 細胞に導入し、トランスフェクション 48 時間後

に取り込み実験に用いた。また、8 週齢雄性 SD ラットから腎臓を摘出して髄質部分を取り除き、膜小胞を作成して、取り込み実験に用いた。[^{14}C]MMA および[^{3}H]succinic acid の細胞内取り込み量を、液体シンチレーションカウンターで測定した。

４．研究成果

（１）ラット内因性 MMA 濃度測定

6 週齢雄性 SD ラットの血漿、尿、腎ホモジネート、および水に MMA をスパイクし、検量線を引いた結果、検量線の傾きはいずれも同等であった。よって、血漿、尿、腎ホモジネートは、内因性 MMA 濃度の測定に影響しないと考えられた。また、MMA をスパイクしていない血漿、尿、および腎ホモジネートにおける対象物質(MMA)と内標準物質(d3-MMA)のピーク面積比を、水を用いて引いた検量線に当てはめることで得られた血漿、尿、腎臓中の内因性 MMA 濃度は、いずれも、0.25 μM 以上であり、本研究に用いた測定系の定量限界以上であった。健常成人における血清中 MMA 濃度と比べてラット血漿中 MMA 濃度が高いことは、過去の報告（Marcell PD. *et al., Anal Biochem.* **150**:58-66 (1985)）と一致した。

（２）OAT 阻害剤投与がラット腎皮質中 MMA 濃度に与える影響

OAT 阻害剤の単回投与実験において、投与 4 時間後の腎皮質中 MMA 濃度は、OAT 阻害剤投与群と生理食塩水のみを投与した対照群で同程度であった。一方、繰り返し投与実験おいて、投与 6 日目における腎皮質中 MMA 濃度は、OAT 阻害剤投与群で、対照群の約半分まで減少した。よって、OAT 阻害剤の単回投与が MMA の腎蓄積に与える影響は乏しいものの、繰り返し投与には、腎皮質中 MMA 濃度の低減効果があることが示された。

（３）MMA 認識尿細管トランスポーターの探索

血漿中 pH 7.4 において、MMA は主にジカルボン酸として存在すると推測されることから、ナトリウムイオン-ジカルボン酸共輸送体(sodium/dicarboxylate cotransporter, NaDC)によって細胞内に取り込まれる可能性がある。近位尿細管に発現する NaDC のうち、以前の検討で、NaDC1 を介した MMA 輸送は示されなかったことから、NaDC3 による基質認識を検討した。ヒト およびラット NaDC3 過剰発現細胞において、[^{3}H]succinic acid の取り込みは、取り込み開始 10 分後まで直線的に増加し、取り込み開始後 30 分までのいずれの点においても 、空ベクターを導入した mock 細胞と比較して有意に高かったことから、遺伝子導入細胞における NaDC3 の機能発現が確認できた。ヒトおよびラット NaDC3 過剰発現細胞における[^{14}C]MMA の取り込みは、取り込み開始 30 分後まで時間依存的に上昇し、取り込み開始 30 分後において、mock 細胞と比較して有意に高かった。よって、ヒトおよびラットいずれの NaDC3 によっても、MMA が基質として認識されることが示された。NaDC3 はヒトおよびラット近位尿細管上皮細胞の側底膜に存在することから、OAT1 に加え、NaDC3 も、MMA の血液側から近位尿細管上皮細胞内への取り込みに関与している可能性が高いことが示された（図 3）。

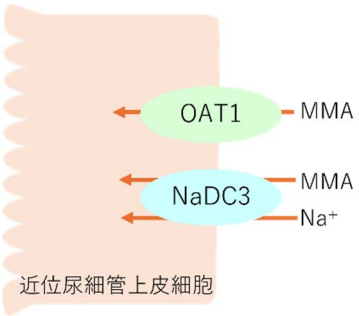

図 3　OAT1 および NaDC3 による
メチルマロン酸の基質認識

さらに、ラット尿細管より調製した膜小胞における[^{3}H]MMA 取り込みの輸送特性を検討し、ラット腎近位尿細管におけるトランスクリプトーム解析データ(GEO accession # GSE13668, Yu M. *et al., Proc Natl Acad Sci USA.* **106**:2441-2446 (2009))を解析することで、MMA 輸送トランスポーター候補を抽出した。そのうちラット Slc10a3 導入細胞における[^{3}H]MMA の取り込みは、mock 細胞と同等であり、rSlc10a3 が MMA を基質とする可能性は低いことが示された（図 4）。

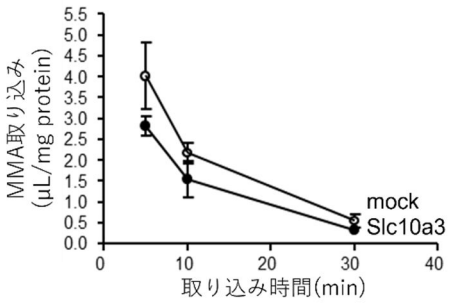

図 4　rSlc10a3 発現細胞を用いた
メチルマロン酸取り込み実験

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Akashi Tomoya、Noguchi Saki、Takahashi Yu、Nishimura Tomohiro、Tomi Masatoshi	４．巻 112
２．論文標題 L-type Amino Acid Transporter 1 (SLC7A5)-Mediated Transport of Pregabalin at the Rat Blood-Spinal Cord Barrier and its Sensitivity to Plasma Branched-Chain Amino Acids	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	６．最初と最後の頁 1137～1144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2022.12.028	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5件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 小林 咲央里，野口 幸希，中田 柚貴子，西村 友宏，登美 斉俊
２．発表標題 近位尿細管有機アニオントランスポーターを介したメチルマロン酸の輸送の評価
３．学会等名 日本薬学会第143年会
４．発表年 2023年

１．発表者名 榊原 早織，野口 幸希，平原 優有，舟橋 和毅，加島 里菜，西村 友宏，登美 斉俊
２．発表標題 アンジオテンシンII受容体拮抗薬（ARBs）の経細胞輸送におけるOAT4の役割
３．学会等名 日本薬物動態学会第37回年会
４．発表年 2022年

１．発表者名 野口幸希、榊原早織、平原優有、舟橋和毅、増田豪、大槻純男、西村友宏、登美斉俊
２．発表標題 OAT4を介したアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬の経細胞輸送評価
３．学会等名 日本薬剤学会第38年会
４．発表年 2023年

１．発表者名 Noguchi Saki, Nakada Yukiko, Nishimura Tomohiro, Tomi Masatoshi
２．発表標題 Uptake of methylmalonic acid by proximal tubular transporters
３．学会等名 日本薬物動態学会第38回年会／第23回シトクロムP450国際会議国際合同大会（国際学会）
４．発表年 2023年

１．発表者名 野口幸希、榊原早織、平原優有、舟橋和毅、増田豪、大槻純男、西村友宏、登美斉俊
２．発表標題 OAT4介在輸送がアンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)の経細胞透過に果たす役割
３．学会等名 日本薬学会第144年会
４．発表年 2024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