

のぐち さき	
氏名	野口 幸希
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博士甲第 4623 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	ヒト organic anion transporter 4 による薬物輸送の両方向性と その胎盤特異的な発現制御
論文審査委員	(主査) 教授 登美 齊俊 (博士(薬学)) (副査) 教授 大谷 壽一 (博士(薬学)) 教授 齋藤 英胤 (医学博士)

論文内容の要旨

【背景】

ヒト SLC22A11 遺伝子によってコードされる organic anion transporter 4 (OAT4) は、腎近位尿細管上皮細胞の刷子縁膜(尿細管腔側)および胎盤関門の基底細胞膜(胎児側)のみに発現する薬物トランスポーターである。そのため、OAT4 は基質薬物の排泄や分布(胎児移行)制御において重要な役割を果たしている可能性が高く、具体的には OAT4 が主に薬物の取り込み輸送を担うことが報告されているため、原尿あるいは胎児血液から(母体)血液への再吸収方向に薬物を輸送すると考えられている。ただし、パラアミノ馬尿酸は OAT4 を介して細胞内から細胞外に排出輸送されるとの報告も存在するため、OAT4 による薬物輸送の方向性は議論すべき課題である。また、ヒト OAT4 のオルソログが存在するのは一部の霊長類のみであり、げっ歯類には存在しない。そのため、ノックアウトマウスなど動物を用いた OAT4 の機能解明は困難であり、OAT4 が基質薬物の排泄や胎児移行に与える影響の態様は明確にされていない。一方、OAT4 発現における種差は、OAT4 が動物レベルでは再現不能な薬物相互作用や毒性発現などに関与する可能性を提示するものであり、ヒト体内動態に有意に影響しうる OAT4 の基質薬物とその輸送機構を方向選択性も含めて明らかにする研究がまず必要である。

本研究では、OAT4 を介した輸送が体内動態に影響しうる薬物を絞り込むうえで、薬物の排泄や胎児毒性において種差が存在する 2 つの薬物に着目した。第 1 に、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬(angiotensin-II receptor blocker: ARB)である olmesartan は、約 40%が腎排泄によって消失し、その腎クリアランスは糸球体濾過クリアランスよりも大きいことから、尿細管上皮細胞を介した分泌過程が存在する。一方、マウスにおける olmesartan の腎クリアランスは、ヒトとは対照的に、糸球体濾過クリアランスよりも小さい。また、母体に投与された ARB は、胎盤を透過して胎児に到達することで胎児腎不全を引き起こし、羊水過少症等の致命的な胎児毒性の原因になると考えられてい

る。しかし、げっ歯類では olmesartan 等の ARB による重篤な胎児毒性は示されない。ヒト胎盤関門透過過程は ARB による胎児毒性発現に結びつくため重要であるが、ARB の胎盤透過機構は明らかでない。OAT4 を介した基質取り込み輸送に対する olmesartan の阻害効果は強いことから、OAT4 を介した olmesartan 輸送がヒトにおける腎クリアランスや胎児毒性発現に影響する可能性がある。第 2 に、抗ヒスタミン薬である cetirizine は levocetirizine と dextrocetirizine のラセミ体であり、ほとんどが未変化体として尿中排泄され、ヒトにおける腎クリアランスは糸球体濾過クリアランスより大きい。尿細管上皮細胞を介した分泌過程が存在する。ヒトにおける levocetirizine の腎クリアランスは dextrocetirizine の腎クリアランスの約半分であるが、ラットにおける cetirizine の血中濃度推移には立体選択性が示されていない。腎クリアランスの立体選択性に種差が示唆されることから、cetirizine の尿細管上皮細胞を介した輸送過程を理解する上で、特に OAT4 の関与について検討することは重要である。

腎臓や肝臓において有機アニオン輸送を担う SLC22A 有機アニオントランスポーターファミリーのうち、胎盤における機能発現が報告されているのは OAT4 のみである。したがって、OAT4 は胎盤関門を介した有機アニオン系薬物の輸送において主要な役割を果たしている可能性が高い。OAT4 の胎盤特異的な発現制御機構を明らかにすることは、妊娠進行や個体間・病態時における OAT4 の発現変動を理解し、胎児への薬物曝露による影響を予測する上で重要である。腎臓において OAT4 は、OAT1 や OAT3 と同様に、転写因子である HNF1 により制御される。しかし、胎盤において HNF1 による遺伝子発現制御は知られておらず、OAT4 の胎盤における発現制御についてもほとんど明らかにされていない。胎盤由来 SLC22A11 mRNA の長さは腎臓由来のものよりも短く、これは 5'非翻訳領域の長さの違いに起因すると報告されている。そのため、OAT4 の胎盤における発現を制御するプロモーター配列および転写因子は腎臓におけるものとは異なり、胎盤特異的な OAT4 発現制御機構が存在する可能性が高い。

【目的】

本研究では、ヒト OAT4 が持つ方向選択的な薬物輸送機構と臓器選択的な発現機構を明らかにすることを目的とし、以下の解析を行った。第 1 に、薬物動態に種差が示唆される olmesartan と levocetirizine に着目し、ヒト胎盤関門基底細胞膜(basal plasma membrane: BM)における olmesartan 輸送への OAT4 の関与と、OAT4 を介した olmesartan および levocetirizine の取り込みおよび排出輸送機構について解析した。第 2 に、胎盤特異的な OAT4 発現制御機構を明らかにするため、胎盤における OAT4 発現に必要な転写制御領域について解析を行った。

【方法】

ヒト胎盤絨毛膜面分より調製した BM ベシクルおよび tetracycline 誘導性 OAT4 発現細胞(T-REx OAT4-293)を用いて³H]olmesartan の輸送特性を解析した。T-REx

OAT4-293 細胞による levocetirizine および cetirizine の取り込みおよび排出量は、LC/MS-MS によって定量し、OAT4 を介した輸送を評価した。ヒト OAT4 の転写開始点は、市販のヒト胎盤および腎臓由来 total RNA を用いた 5'RACE 法により同定した。SLC22A11 (NM_018484) 5'隣接領域による転写活性は、胎盤栄養膜細胞モデルとしてヒト絨毛癌由来 JEG-3 細胞を、腎上皮細胞モデルとしてはフクロネズミ近位尿細管由来 OK 細胞をそれぞれ用い、ルシフェラーゼアッセイによって解析した。尚、本研究は、慶應義塾大学薬学部研究倫理委員会（150421-2、胎盤を介した母体胎児間物質透過メカニズムに関する研究）および慶應義塾大学医学部倫理委員会（20110250、胎盤を介した母体胎児間物質透過メカニズムに関する研究）に研究計画書を提出し、その内容が承認されたものである。

【結果】

1. OAT4 を介した olmesartan および levocetirizine の輸送特性解析

OAT4 には、細胞内ジカルボン酸を有機アニオン取り込み輸送の駆動力として用いる輸送形式に加え、Cl⁻と有機アニオンを交換輸送する輸送形式があると考えられている。ヒト胎盤 BM ベシクルによる [³H]olmesartan 取り込みは、Cl⁻がベシクル外に存在せず、ジカルボン酸である glutarate がベシクル内に存在する条件で上昇し、OAT4 の典型的基質である dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)、estrone-3-sulfate、および bromosulfophthalein 各 1 mM により強く阻害された。そのため、ヒト胎盤 BM における olmesartan 輸送への OAT4 の関与が示唆された。Tetracycline 処理した T-REx OAT4-293 (OAT4 発現)細胞による [³H]olmesartan 取り込みは、tetracycline 非処理 (mock)細胞と比較して有意に高かったことから、olmesartan が OAT4 の基質となることが示された。OAT4 を介した [³H]olmesartan の取り込み活性は、BM ベシクルと同様に細胞外 Cl⁻非存在下および細胞内 glutarate 存在下で上昇し、Cl⁻非存在下での取り込みの K_m 値は 20 μ M であった。さらに、OAT4 を介した olmesartan の排出輸送について解析したところ、細胞内にあらかじめ取り込ませた [³H]olmesartan の細胞外への排出は、OAT4 発現細胞において細胞外 Cl⁻存在下で促進され、Cl⁻非存在下であっても細胞外に DHEAS が 1 μ M 以上存在する条件において促進された。

Levocetirizine についても、olmesartan と同様に OAT4 を介した輸送の方向性を解析した。OAT4 発現細胞において levocetirizine の取り込みは顕著に上昇したが、その取り込み活性は、olmesartan とは対照的に、細胞外 Cl⁻の有無によって変化しなかった。細胞内にあらかじめ取り込ませた levocetirizine の細胞外への排出は、OAT4 発現によって促進されず OAT4 発現の有無にかかわらず、細胞外 Cl⁻存在下で促進された。OAT4 を介した levocetirizine 取り込みの K_m 値は 38 μ M であった。OAT4 と cetirizine の相互作用が立体選択的であるか検討するため、OAT4 を介した cetirizine (ラセミ体) と levocetirizine の取り込みを比較したところ、OAT4 を介した levocetirizine の取り込み

活性は cetirizine の取り込み活性と比べて約 2 倍高かった。

2. 胎盤特異的な OAT4 発現制御

参照配列の転写開始点を+1としたとき、ヒト腎臓由来 RNA から得られた 10 個の SLC22A11 cDNA クローンの 5'末端は、全て+22 に存在していた。一方、ヒト胎盤由来 RNA から得られた 20 個の SLC22A11 cDNA クローンの 5'末端は、+300 付近(+215~+318)に位置していた。腎臓での転写開始点(+22)までの SLC22A11 5'隣接領域は、OK 細胞において転写活性を示したが、JEG-3 細胞においては転写活性を示さなかった。一方、胎盤における転写開始点周辺(+298)までを含む 5'隣接領域は、JEG-3 細胞においても転写活性を示し、OK 細胞ではさらに高い転写活性を示した。胎盤における SLC22A11 5'隣接領域(-228/+298)を 5'側から切断していく 5'欠失解析を行った結果、JEG-3 細胞における転写活性は、腎臓で OAT4 発現制御因子として報告されている HNF1 結合配列を除いても変化しなかったが、(+158/+200)領域を切断することにより顕著に減少した。(+158/+200)領域中に存在する AP-2 結合配列に変異を加えることによって、転写活性の著しい減少が示されたが、GATA 結合配列への変異導入では転写活性の有意な変化は示されなかった。

【考察】

OAT4 が olmesartan と levocetirizine を基質として認識することが明らかになった。OAT4 は両方向性の基質輸送能を有し、特に生理的な内向き Cl⁻勾配存在下では、olmesartan を排出方向に輸送することが示された。一方、OAT4 は、levocetirizine を取り込み方向に輸送するが、細胞外 Cl⁻との交換輸送による levocetirizine の排出への関与を示す根拠は見出せなかった。

ヒト胎盤 BM ベシクルにおける olmesartan 輸送特性は OAT4 によるものとよく一致したことから、OAT4 がヒト胎盤 BM における olmesartan 輸送に関与することが示唆された。胎児血中には Cl⁻に加え、胎盤における OAT4 の内因性基質である DHEAS や 16 α -OH DHEAS が、OAT4 を介した olmesartan の排出輸送を促進し得る濃度で存在する。したがって、母体に投与された olmesartan の胎児循環への排出は、胎盤関門 OAT4 を介して、胎児循環中の Cl⁻や胎児由来の硫酸ステロイドとの交換輸送によって促進される可能性が示された。ARB による胎児毒性の種差を規定する因子としては、胎児移行性における種差だけではなく、胎児腎の発達や標的受容体であるアンジオテンシン II タイプ 1 (AT1)受容体の発現における種差などが考えられる。ヒト胎児腎における糸球体形成の完了やARBの標的となる AT1 受容体の発現時期はげっ歯類よりも早いものの、ラット妊娠後期において胎児腎は AT1 受容体を発現しており、その発達状況もヒトで ARB による胎児毒性が報告され始める時期の腎発達状況に相当する。そのため、胎盤から胎児への OAT4 を介した輸送機構の存在もヒトにおける ARB の胎児毒性発現に寄与しうる機構として考慮すべきである。

OAT4 発現細胞における olmesartan 輸送実験の結果を尿細管上皮細胞刷子縁膜に発

現する OAT4 を介した輸送に当てはめると、OAT4 は原尿中 Cl⁻との交換輸送により olmesartan の排出輸送を促進することが可能である。Olmesartan は multidrug resistance-associated protein (MRP) 2 および 4 の基質でもあることから、尿細管分泌にもこれらが関与すると考えられているが、尿細管分泌の種差については、ヒトにおける OAT4 を介した olmesartan 排出機構が関与する可能性が示された。

一方、levocetirizine 輸送実験の結果を尿細管上皮細胞における OAT4 を介した輸送に当てはめると、OAT4 は尿中から尿細管細胞内への levocetirizine の再吸収を担うことが可能である。取り込み活性の違いから、OAT4 はラセミ体の cetirizine のうち、levocetirizine を立体選択的に細胞内に取り込むことが示唆された。本研究により示された OAT4 を介した cetirizine の輸送特性は、ヒトにおける cetirizine エナンチオマー間の腎クリアランスの差と相関したことから、OAT4 を介した levocetirizine の取り込み輸送がヒト-ラット間で異なる cetirizine 体内動態における立体選択性の一部を担う可能性が示された。

胎盤栄養膜細胞モデルである JEG-3 細胞において、腎臓における転写開始点を含む 5'隣接領域によって示されなかったプロモーター活性が、さらに下流に存在する胎盤における転写開始領域を含めることで示されたことから、OAT4 のプロモーター領域が胎盤と腎臓で異なることが明らかとなった。5'欠失解析の結果からも参照配列の転写開始点より下流に存在する(+158/+200)領域が胎盤での OAT4 基礎転写活性に必須であることが初めて示された。腎上皮細胞モデルである OK 細胞において HNF1 結合配列の欠失により示されたプロモーター活性の減少が、JEG-3 細胞においては示されなかったことから、ヒト胎盤 OAT4 の発現制御に HNF1 が関与する可能性は低い。(+158/+200)領域に結合配列が見出された AP-2 および GATA ファミリーのうち、AP-2 α/γ および GATA2/3 は、ヒト胎盤および JEG-3 細胞での発現が確認されている。AP-2 結合配列への変異導入により、JEG-3 細胞における OAT4 プロモーター活性の有意な減少が示されたことから、AP-2 結合領域が胎盤における OAT4 発現の制御領域としての機能を果たすことが示された。AP-2 α/γ の発現量は胎盤の分化や妊娠高血圧腎症胎盤で変化し、AP-2 α/γ は、placental leucine aminopeptidase や human placental lactogen、human chorionic gonadotropin 等の胎盤特異的な遺伝子発現制御への関与が報告されている。OAT4 の胎盤特異的な発現制御にも AP-2 α/γ が関与する可能性がある。

【結論】

本研究により、OAT4 がヒト胎盤関門 BM における olmesartan 輸送に関与し、olmesartan は OAT4 を介して排出方向にも輸送されることが明らかになった。本研究は、OAT4 を介して薬理活性物質が両方向に輸送されることを明らかにした知見である。本研究の結果、OAT4 の有する基質輸送機能において、levocetirizine と olmesartan はそれぞれ取込み型と両方向型の薬物として位置づけられた。OAT4 によって細胞外に排

出輸送される薬物の場合、OAT4による薬物の胎児暴露促進により、げっ歯類での検討よりも重篤な胎児毒性を呈する可能性が考えられる。また、本結果は、ヒト腎クリアランスを考慮する上でも、OAT4の基質となる薬物については輸送方向性の検討が肝要であることを示した重要な知見である。さらに、ヒト OAT4 プロモーター領域は胎盤と腎臓で異なることを明らかにし、胎盤における OAT4 の発現制御に重要な転写領域を同定した。本結果は、胎盤特異的な OAT4 発現制御機構を包括的に解明する端緒となる発見である。

論文審査結果の要旨

OAT4 は薬物排泄に重要な腎上皮細胞および薬物胎児移行を司る胎盤関門のみに発現する薬物トランスポーターであるが、OAT4 が薬物動態に与える影響の態様は明確ではない。

本研究の第一の重要な意義は、olmesartan および levocetirizine が OAT4 の基質となることを明らかにし、levocetirizine は OAT4 を介して取り込み方向に、olmesartan は OAT4 を介して排出方向にも輸送されることを示した点である。本研究を通じ、OAT4 が薬理活性物質に対する非対称性交換輸送体として機能し、非対称性の取り込み型、排出型の基質に加え、両方向輸送型の OAT4 基質薬物が存在することが明らかになった。

OAT4 がヒトなどの一部霊長類でのみ発現が見出されているトランスポーターであることから、申請者は、薬物で体内動態に種差が示唆される olmesartan と cetirizine に着目し、OAT4 を介した輸送方向性について解析した。OAT4 は取り込みおよび排出の両方向に olmesartan を輸送し、生理的な内向き Cl⁻濃度勾配存在下では、OAT4 を介した olmesartan の排出輸送が促進されることを明らかにした。Levocetirizine については、ラセミ体 cetirizine との取り込み活性の比較から、OAT4 が levocetirizine を立体選択的かつ取り込み方向に輸送することを示したが、排出への関与を示唆する根拠は見出されなかった。以上の結果は、ヒトにおいて検出される olmesartan の尿細管分泌過程に近位尿細管刷子縁膜に発現する OAT4 が関与する可能性を提示している。一方、levocetirizine については、OAT4 が近位尿細管における再吸収に関与可能であることを示唆している。OAT4 を介した cetirizine エナンチオマーの立体選択的な取り込みは、ヒトにおける cetirizine エナンチオマー間での腎クリアランスの違いと相関しており、OAT4 はヒトにおける cetirizine の立体選択的な体内動態の一部を担う可能性がある。

さらに、申請者は、胎盤関門基底細胞膜ベシクルを用いた検討から、OAT4 が胎盤関門基底細胞膜における olmesartan 輸送に関与することを明らかにした。特に細胞外 Cl⁻および DHEAS 存在下、OAT4 を介した olmesartan の排出輸送が促進されることを示しており、胎盤関門における OAT4 は、olmesartan の胎児循環への移行に関与可能であることを見出した。胎盤関門の OAT4 は、取り込み輸送を介して有害物質からの

胎児保護にはたらくと考えられてきたが、OAT4 を介した olmesartan の排出輸送が機能している場合、OAT4 を介した胎児暴露の促進が、ヒトでげっ歯類における検討よりも重篤な olmesartan の胎児毒性発現を助長する可能性を提示している。

第二の重要な意義は、胎盤選択的な OAT4 発現制御機構を司るプロモーター領域を明らかにしたことである。本研究では、胎盤における OAT4 の発現が、腎臓とは異なる胎盤特異的な機構で制御されることを見出した。

胎盤 OAT4 の発現を制御する転写因子およびプロモーター領域は腎臓とは異なる可能性があったことから、申請者は、胎盤における OAT4 の発現に必要な転写制御領域について解析した。まず、市販のヒト胎盤および腎臓由来 RNA を用いた 5'RACE により、ヒト胎盤における OAT4 の転写開始点が腎臓におけるものよりも約 300 塩基下流に存在することを明らかにした。胎盤栄養膜モデル JEG-3 細胞と腎臓上皮モデル OK 細胞において、それぞれの臓器における転写開始点が転写活性に与える影響をルシフェラーゼアッセイで解析した結果、OAT4 のプロモーター領域が胎盤と腎臓で異なることを明らかとし、変異ベクターを用いた解析により、参照配列や腎における転写開始点よりも約 200 塩基下流に存在する AP-2 転写因子結合配列が胎盤関門 OAT4 の基礎転写活性に重要な領域であることを見出した。AP-2 ファミリーのうち、ヒト胎盤には AP-2 α/γ が発現しており、これらは OAT4 の胎盤特異的な発現制御に関与する可能性がある。本研究を通じた胎盤特異的な遺伝子発現機構研究の発展により、薬物の胎児移行予測に向けた応用研究などが進展することが期待できる。

試問においても申請者の応答は的確であり、自らの研究成果について深く洞察した上で導かれた自身の見解を明確に示していた。以上から、本論文は博士（薬学）の学位論文に値すると認める。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

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* 104(9): 3128-3135 (2015).

【参考論文】

Tomi M, Miyata Y, Noguchi S, Nishimura S, Nishimura T, Nakashima E: Role of protein kinase A in regulating steroid sulfate uptake for estrogen production in human placental choriocarcinoma cells, *Placenta* 35(8): 658-660 (2014).