

新規ループ利尿薬 M17055 の腎排泄機構

西村友宏¹⁾、崔 吉道¹⁾、加藤将夫¹⁾、萩原琢男²⁾、辻 彰¹⁾
金沢大・薬¹⁾、持田製薬・創薬研²⁾

Renal Excretion Mechanism of a Novel Loop Diuretic, M17055

Tomohiro NISHIMURA¹⁾, Yoshimichi SAI¹⁾, Yukio KATO¹⁾,
Takuo OGIHARA²⁾, and Akira TSUJI¹⁾

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, 13-1 Takara-machi, Kanazawa,
920-0934¹⁾ and Drug Metabolism and Pharmacokinetics Laboratory Reserch Center,
Mochida Pharmaceutical Co., LTD, 722 Jimba-aza-uenohara,
Gotenba, Shizuoka, 412-8524²⁾, Japan*

M17055 is under development as a novel diuretic which inhibits both Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ exchange at the thick ascending Henle's loop and Na⁺ reuptake at the distal tubule of the kidney. Estimated renal clearance indicated that M17055 was secreted from blood into lumen at the proximal tubule although the exact excretion mechanism was still unclear. The purpose of the present study was to clarify the renal excretion mechanism of M17055. We used the renal cortical slices to investigate the transport mechanism across the basolateral membranes of proximal tubules. M17055 uptake by rat renal slices was linearly increased with the time and was saturable. Several organic anions including probenecid, para-aminohippurate (PAH) and estrone-3-sulfate, decreased M17055 uptake. The uptake of M17055 by HEK 293 cells expressing rat OAT1 was also observed and was inhibited by PAH. These results suggest that organic anion transport systems are involved in M17055 transport via basolateral membranes of proximal tubule epithelial cells, a part of the renal uptake being via OAT1.

Key words: loop diuretics, renal excretion, organic anion transporters

【緒言】腎臓は薬物や生体外異物を排泄する重要な臓器であり、その排泄機構は糸球体濾過に加え、一部の薬物では近位尿細管における血液側から管腔側への能動的な分泌が知られている。

新規利尿薬として開発が進む M17055 (図 1) はループ利尿薬に分類され、求められ

た腎クリアランスは糸球体濾過速度よりも有意に大きく、M17055 は尿細管で分泌されることが示唆されている(1)。近位尿細管で管腔側へ分泌された M17055 は、ヘンレのループの上行脚において Na⁺、K⁺、2Cl⁻ 共輸送系を阻害し、さらに遠位尿細管において Na⁺ の再吸収を阻害することで強力な

利尿効果を現す(2)。したがって M17055 の腎排泄機構の解明は、体内からの消失過程の解明のみならず、薬理効果に影響する因子の解明にもつながり、有用な知見となる。本研究では腎での分泌において最初の段階である血液側から尿細管上皮細胞への取込み過程を明らかにすることを目的とした。

【実験の部】 Wistar 系 7 週齢雌雄ラットを用い、常法に従って腎スライスへの [¹⁴C]M17055 の取込みを検討した。直線的な取込みを示す初期時間で、各種阻害剤による阻害効果の検討および速度論解析を行った。また rOAT1/pAdTrack-CMV を HEK293 細胞にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションし、シリコンレイヤー法に従って [¹⁴C]M17055 の取込み実験を行った。ベクターのみをトランスフェクションした HEK293 細胞 (Mock 細胞) と比較することで、rOAT1 による輸送活性を評価した。rOCT2/pSPORT1 より cRNA を作製し、アフリカツメガエルの卵母細胞にマイクロインジェクションした。18℃で3日間培養後、室温でその取込みを検討した。

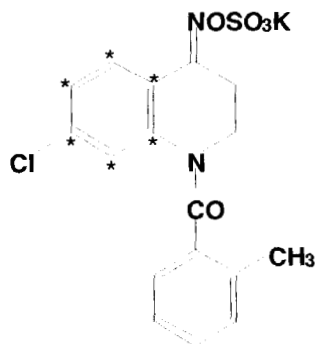


図1 [¹⁴C]M17055 の化学構造式 (*標識部位)

【結果・考察】ラット腎スライスへの M17055 の取込みは経時的に増加した。取込みの経時変化が直線を示す範囲で、その初期取込み時間を 10 分と設定した。次に各種有機アニオン輸送系、有機カチオン輸送系の阻害剤を用いて、阻害効果を検討した(図2)。有機アニオントランスポーターの代表的な阻害剤である probenecid は M17055 の取込みを顕著に阻害した。ラットの有機アニオンの腎取込みにおいて、主要な役割を果たすと考えられている rOAT1、rOAT3 を選択的に阻害することを目的として、p-aminohippuric acid (PAH)、benzylpenicillin G (PCG) をそれぞれ阻害剤に用いた(3)。コントロールに比べて PAH では雌雄共に 20%程度、PCG では雄性で約 40%、雌性で約 20%の有意な阻害が観察された。またこれら2つの阻害剤を併用した場合には、相加的な阻害効果を示した。

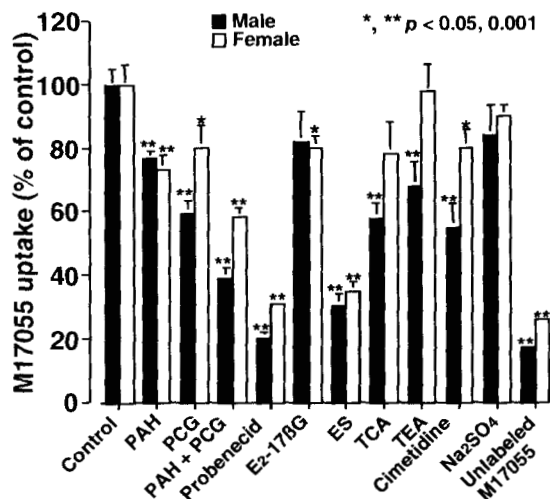


図2 ラット腎スライスへの M17055 の取込みに対する各種阻害剤の影響

したがって、M17055 の腎取込みの一部には有機アニオン輸送系が寄与していることが示唆された。

また、有機カチオン性の化合物である tetraethylammonium (TEA)、cimetidine による阻害効果には雌雄で差が認められ、雄性ラットの方が雌性に比べ、強く阻害を受けた。ラットの尿細管上皮細胞の基底膜に発現する主なカチオン輸送系には rOCT1 と rOCT2 が知られており、そのうち rOCT2 は雄性ラットにおいて雌性ラットに比べ有意に強く発現していることが報告されている(4)。そのため、M17055 の腎取込みには rOCT2 が関与する可能性が考えられた。

次に M17055 のラット腎スライスへの取込みに対する速度論解析を行った。雌雄共に M17055 の取込みは濃度依存的に飽和性を示し、ミカエリス定数 (K_m) および最大速度 (V_{max}) は、11 μM (K_{m1})、1.4 mM (K_{m2}) および 32 pmol/10 min/mg kidney (V_{max1})、1.5 nmol/10 min/mg kidney (V_{max2}) (以上、雄性)、3.7 μM (K_{m1})、7.0 mM (K_{m2}) および 16 pmol/10 min/mg kidney (V_{max1})、5.9 nmol/10 min/mg kidney (V_{max2}) (以上、雌性) となった。固有の取込み活性の指標となる V_{max}/K_m は雄性で $V_{max1}/K_{m1}:V_{max2}/K_{m2}=3:1$ となり、高親和性の輸送系の寄与が大きいことが分かる。さらに、雌性でも $V_{max1}/K_{m1}:V_{max2}/K_{m2}=5:1$ となり、やはり高親和性の輸送系の寄与が大きいと言える。

M17055 の腎取込みに寄与することが示唆されたトランスポーターのうち rOAT1 と rOCT2 について、発現系を用いてその

輸送活性を評価した。

rOAT1 をトランスフェクションした HEK293 細胞への M17055 の取込みは経時的に増加し、Mock 細胞に比べて有意な取込み活性を示した (図 3)。取込みが直線的に増加する時間である 2 分を初期取込み時間と設定した。また、ラット腎スライスでの阻害効果の検討と同濃度の阻害剤を用いてその阻害効果を検討した。PAH による阻害効果は顕著であり、Mock 細胞と同程度まで M17055 の輸送は阻害された。一方、PCG による阻害効果は観察されなかった。この結果により、M17055 は rOAT1 を介して腎に取り込まれ、その寄与は全体の取込みの多くとも 20%程度であると見積もることができる。さらに、当初の期待通り、PCG は rOAT1 による輸送を阻害せず、腎スライスにおける PCG による阻害効果は rOAT3 を含む rOAT1 以外の輸送系の寄与の可能性を支持すると言える。

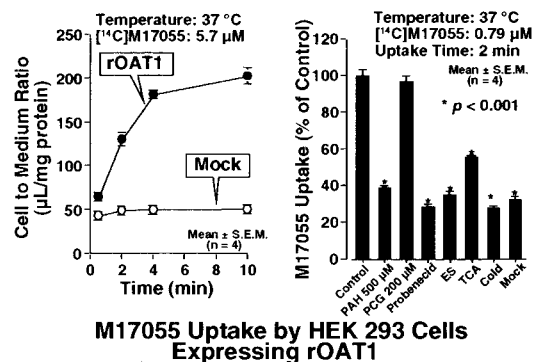


図 3 rOAT1/HEK293 への M17055 の取込みの時間推移と各種阻害剤の影響

代表的なループ利尿薬である furosemide は腎尿細管で分泌を受けると考えられている。ウサギにおいては furosemide の腎排泄

は probenecid の併用投与によって大部分が阻害され、PAH の併用により約半分が阻害されることが報告されている(5)。また、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた検討より furosemide の輸送に rOAT1 が一部関与することが示唆され、furosemide の腎排泄には rOAT1 を含む複数の輸送機構の寄与が考えられている(6)。本研究において rOAT1 を含む複数の輸送系の関与が示唆された M17055 は furosemide と構造的には類似しないものの、前述の様な点において furosemide と一部類似した腎排泄機構を介して尿細管腔中へ分泌され、この積極的な腎分泌がループ性利尿薬の薬効発現にも寄与している可能性が考えられる。

一方、rOCT2 から作製した cRNA をマイクロインジェクションしたアフリカツメガエルの卵母細胞は、代表的な有機カチオンである TEA を有意に取り込んだが、M17055 に対する輸送活性は未だ検出されておらず、現在検討を重ねている。

【結論】ループ性利尿薬である M17055 はラット腎スライスを用いた検討から、尿細管上皮細胞へ血管側から濃縮的に取り込まれ、その取込み機構には少なくとも複数の有機アニオントランスポーターが関与することが示された。発現系を用いた検討より、その分子種の一つは rOAT1 であると考えられた。

【REFERENCES】

1. Nakajima H., Nakanishi T., Naba H., Nakai K., Matsumoto S., Nagasawa K., Ida

K., Ogihara T., Ohzawa N. Studies on the metabolic fate of M17055, a novel diuretic (6). Assessment for drug-drug interactions of M17055 in metabolism, distribution and excretion. *Xenobiotica*. 32: 1161-1172, 2002

2. Shinkawa T., Yamasaki F., Notsu T., Nakakuki M., Nishijima K., Yoshitomi K., Imai M. Loop and distal actions of a novel diuretic, M17055. *Eur. J. Pharmacol.* 238: 317-325, 1993

3. Hasegawa M., Kusuhashi H., Sugiyama D., Ito K., Ueda S., Endou H., Sugiyama Y. Functional Involvement of Rat Organic Anion Transporter 3 (rOat3; Slc22a8) in the Renal Uptake of Organic Anions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300: 746-753, 2002

4. Urakami Y., Nakamura N., Takahashi K., Okuda M., Saito H., Hashimoto Y., Inui K. Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 in rat kidney. *FEBS Letters* 461: 339-342, 1999

5. Bidiville J., Roch-Ramel F. Competition of organic anions for furosemide and p-aminohippurate secretion in the rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237: 636-643 (1986)

6. Uwai Y., Saito H., Hashimoto Y., Inui K. Interaction and Transport of Thiazide Diuretics, Loop Diuretics, and Acetazolamide via Rat Renal Organic Anion Transporter rOAT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295: 261-265, 2000