

1307 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の腎近位尿細管分泌における細胞外排泄機序の評価

坂田 大仁

(指導教員：川井 恵一教授，小林 正和助教，西 弘大助教)

要旨：[^{99m}Tc]-Mercaptoacetylglycylglycylglycine ($^{99m}\text{Tc-MAG}_3$)は、臨床核医学検査で有効腎血漿流量などから腎機能を調べるために用いられているが、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の排泄機序の詳細な検討は行われていない。腎近位尿細管における $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の分泌に関与する排泄型薬物トランスポーターを新たに評価することにより、特定の排泄型薬物トランスポーターの機能低下による腎障害を識別できる可能性がある。本研究では、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の近位尿細管上皮細胞における分泌を評価し、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の細胞外への排泄に関与する薬物トランスポーターを特定することを目的とした。現在、腎近位尿細管の管腔側に発現している排泄型薬物トランスポーターとして P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 2, 4 (MRP2, MRP4), breast cancer resistance protein が知られている。この4種類の排泄型薬物トランスポーターを個々に発現させたベシクルへの $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の集積を測定した結果、MRP2 と MRP4 発現ベシクルにおいて顕著な ATP 依存性が確認され、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の細胞外排泄への MRP2, MRP4 の関与が確認された。さらに、ブタ由来近位尿細管上皮細胞である LLC-PK₁ を用いた経細胞輸送実験において、MRP 特異的阻害剤である MK571 負荷時に、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の分泌が有意に阻害されたことにより、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の近位尿細管分泌における細胞外排泄機序にも、MRP2, MRP4 が関与していることが確認された。これらの結果から、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ を用いる検査によって得られたレノグラムにより、排泄型薬物トランスポーターである MRP2, MRP4 の機能を評価することができ、これらの機能低下を原因とした腎障害の識別の可能性が示された。

I. はじめに

腎臓は最も動脈血流量の多い臓器であり、血液浄化機能は腎臓の最も重要な機能である。血液浄化の結果発生する尿は、血液濾過する糸球体と再吸収や代謝産物を選択的に分泌・排泄する尿細管で成分調整される。

臨床核医学検査における腎動態シンチグラフィは、 ^{99m}Tc 製剤の動態を経時的に観察することによる予後推定や透析導入時期の決定に有用である。現在臨床の場で利用されている [^{99m}Tc]-mercaptoacetylglycylglycylglycine ($^{99m}\text{Tc-MAG}_3$)は、血漿蛋白との結合が 90% と高いため、糸球体濾過成分は約 5% と少なく、近位尿細管より尿中に排泄され、1 回腎循環での抽出率は約 60% である。 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ を用いた検査では、有効腎血漿流量あるいは尿細管抽出率から腎機能を評価する¹⁾。

Fig. 1 に示すように、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ は organic anion transporter1 (OAT1)によって、基底膜側 (Basal)から細胞内へ取り込まれている²⁾。また、複数存在する排泄型薬物トランスポーターのうち近位尿細管の刷子縁膜側 (Apical)では、P-glycoprotein (P-

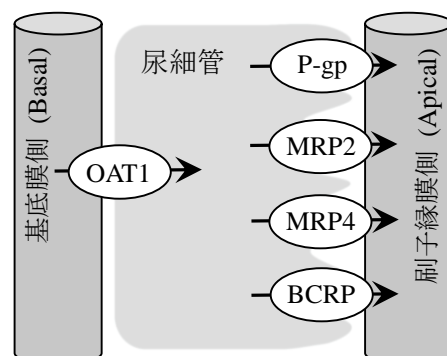


Fig. 1 尿細管に発現する薬物トランスポーター

gp), multidrug resistance-associated protein 2, 4 (MRP2, MRP4), breast cancer resistance protein (BCRP) の 4 種類の排泄型薬物トランスポーターのみが発現していることが現在報告されている³⁾. しかし、腎近位尿細管における $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の排泄機序の詳細な検討が行われていないことから、今回新たに $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の排泄に関与する薬物トランスポーターを評価することにより、特定の排泄型薬物トランスポーターの機能低下による腎障害を識別できる可能性がある. 本研究では、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の近位尿細管上皮細胞における分泌を評価し、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の細胞外への排泄に関与する薬物トランスポーターを特定することを目的とした. 上記 4 種類の排泄型薬物トランスポーター (P-gp, MRP2, MRP4 および BCRP) を単一発現させたベシクルを用いて、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の細胞外排泄に関与する薬物トランスポーターの ATP 依存性の検討を行うとともに、ブタ由来近位尿細管上皮細胞である LLC-PK₁ を用いて、経細胞輸送における分泌および再吸収の評価と分泌に関与する細胞外排泄の検討も行った.

II. 排泄型薬物トランスポーター発現ベシクルを用いた実験

A) 実験方法と材料

$^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ は富士フイルム RI ファーマ株式会社から購入し、ABC トランスポーターベシクルおよびベシクル専用試薬キットは GenoMembrane 社から購入して使用した. 実験前夜に、膜フィルタを 400 mM Mops-Tris 緩衝液に浸しておくとともに、1.5 mL エッペンドルフチューブに薬物トランスポーターが発現していないベシクル (control) および 4 種類の薬物トランスポーター発現ベシクル (P-gp, MRP2, MRP4, BCRP) が 0.05 mg/10 μL となるように分注した. 実験当日には、薬液を 1.5 mL エッペンドルフチューブ内に以下のように調整した. Adenosine triphosphate (ATP) または adenosine monophosphate (AMP) 溶液 20 μL に、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ (74 kBq, 10 μL) を加えた. これらに 50 mM Mops-Tris 緩衝液を 0.5 μL 加えた後、MRP 系のベシクルに投与する薬液には試薬キットに含まれる glutathione 溶液、MRP 系以外の薬液には 50 mM Mops-Tris 緩衝液を 0.5 μL 加えた. したがって、1 サンプルあたり 31 μL の薬液を準備した. 分注したベシクルに、50 mM Mops-Tris 緩衝液を 9 μL 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間プレインキュベーションを行った. 次に、ATP あるいは AMP 溶液を加えた $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ を含む溶液を 31 μL 加え、タッピングした後、37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベーションした. 5 分後に 400 mM Mops-Tris 緩衝液を 1 mL 加えて反応を停止した. その後、あらかじめ用意していた膜フィルタに濾過し、400 mM Mops-Tris 緩衝液で 2 回洗浄した. その膜フィルタを試験管に入れ、オートウェルガンマカウンタ (AccuFLEX γ 7000, Aloka) で測定した. また、解析結果はタンパク 1 mg あたりに換算した集積薬剤のモル数で表した.

B) 結果と考察

ベシクルは細胞を反転させたような構造をしており、単一の排泄型薬物トランスポーターを発現させてある. よって、ベシクルは個々の排泄型薬物トランスポーターの排泄への関与を集積として観察できる. また、これらの薬物トランスポーターは ATP 依存性を有しているため、ATP 存在下における薬剤のベシクル内への集積が、AMP 存在下での集積と比べて有意に増加した

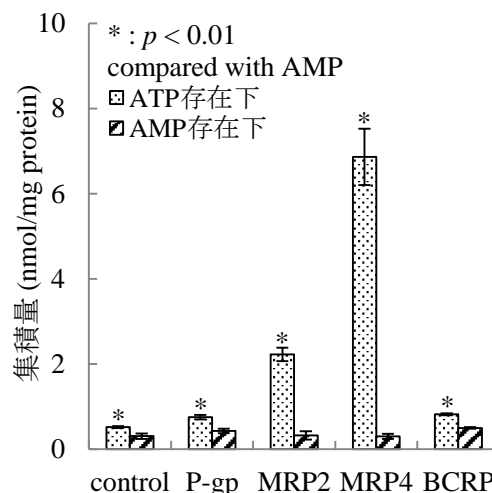


Fig. 2 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の集積量

場合に、そのベシクルに発現させた薬物トランスポーターが薬剤の排泄機序に関与していることを示す。

ベシクルに対する $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の集積をそれぞれ Fig. 2 に示す。 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ では、 control および薬物トランスポーターを単一発現させたベシクル全てにおいて ATP 存在下の集積が AMP 存在下の集積と比較し有意に増加した。しかし、 control における ATP 存在下と AMP 存在下の集積の差は薬物トランスポーターとは無関係な集積であると考えられ、本研究では ATP 存在下と AMP 存在下の集積の差を ATP 依存的集積として、 control における ATP 依存的集積と、薬物トランスポーターを発現させたベシクルにおける ATP 依存的集積を比較し集積が顕著に増加した場合に、そのベシクルに発現させた薬物トランスポーターが $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の排泄機序に関与していると判定した。 Table 1 に示すように、本検討では MRP2, MRP4 発現ベシクルにおける ATP 依存的集積が 10 倍から 20 倍に増加したことから、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の排泄に MRP2, MRP4 が関与していることが示され、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の腎近位尿細管分泌における排泄機序が今回初めて明らかとなった。

| | control | P-gp | MRP2 | MRP4 | BCRP | *: $p < 0.01$ compared with control |
|------|---------|------|--------|--------|------|--|
| Mean | 1.38 | 1.53 | 11.54* | 21.84* | 1.66 | |
| SE | 0.10 | 0.07 | 0.43 | 1.53 | 0.07 | |

III. LLC-PK₁ を用いた $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の経細胞輸送実験

A) 実験方法と材料

経細胞輸送には分泌、再吸収の双方向があり、 LLC-PK₁ は培養することで単層膜を形成することから分泌、再吸収をそれぞれ別々に評価することができる。一般に近位尿細管上皮細胞には複数の薬物トランスポーターが発現しており、薬剤はこれらの薬物トランスポーターによって分泌、再吸収される。 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ は腎循環で尿中に排泄されたのち一部は再吸収を受ける。そこで、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の腎動態を Shikano らの方法⁴⁾を参考に LLC-PK₁ を用いた経細胞輸送実験によって、分泌および再吸収の評価と分泌に関与する細胞外排泄について検討を行った。

Transwell チャンバー (Corning) に 5×10^5 cells/well の LLC-PK₁ を播き、 10 % fatal bovine serum (Gibco) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) を培養液として下層の基底膜側に 1800 μL 、上層の刷子縁膜側に 800 μL 加え、 5 % CO₂, 37 °C の条件下で、 48 時間ごとに培地交換を約 7 日間行い培養し、単層膜を形成させた。

培養液を抜き、 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂ を含む phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) を両側に加え、 10 分間のプレインキュベーションした。分泌の観察では基底膜側に、再吸収の観察では刷子縁膜側に、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ (370 kBq, 100 μL) を投与し、 30 分間インキュベーションした。この間、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ を投与した反対側の PBS を 1, 3, 5, 10 分で経過時間的に 5 μL 採取した。インキュベーション後、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ を投与した反対側から 5 μL 採取し、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の経過時間での輸送量とした。次に、投与側および投与した反対側の PBS を取り除き、両側を 1000 μL の PBS で 2 回洗った後に、細胞膜が形成しているセルロース膜をプレートから切り取り試験管に入れ、オートウェルガンマカウンタで放射能測定した。

競合阻害実験では MRP 阻害剤として、 MK571 sodium salt (Cayman Chemical) を PBS で溶解し最終濃度 50 μM に調整した溶液を使用した。 MRP 阻害剤である MK571 は競合阻害によって $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の細胞への取り込みに関与している OAT を阻害するため、阻害剤の投与位置での分泌の評価を行うことで阻害されるトランスポーターの検討を行った。本研究では、阻害剤を基底膜側に

投与した場合と、刷子縁膜側に投与した場合を比較し、実験方法は上記と同様で、基底膜側への $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ 投与と同時に阻害剤を投与した。

B) 結果と考察

Fig. 3 に示すように、LLC-PK₁ による $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の経細胞輸送量は、分泌が再吸収に比べ顕著に活発であった。MK571 負荷時の $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の分泌はほとんど見られず、経時的变化も認められなかった。また、Fig. 4 に示すように、MK571 無負荷時における LLC-PK₁ への細胞内集積量は、分泌、再吸収共に同程度であった。MK571 を基底膜側へ負荷した場合の集積量は無負荷時と有意な差はなかったが、刷子縁膜側に MK571 を負荷した場合には細胞内集積量は有意に増加した。

これは LLC-PK₁ の刷子縁膜側に存在し、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の細胞外排泄に関与すると推測される MRP2, MRP4 のみが MK571 によって阻害された結果、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の排泄量が減少し細胞内集積量が増加したためと考えられた。

IV. 結語

本研究によって、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の腎近位尿管分泌における細胞外排泄への MRP2, MRP4 の関与が確認された。この結果から、 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ を用いる検査によって得られたレノグラムにより、排泄型薬物トランスポーターである MRP2, MRP4 の機能評価を行うことができ、これらの機能低下を原因とした腎障害の識別の可能性が示された。

V. 謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導くださいました川井恵一教授、小林正和助教、西 弘大助教およびご協力いただいた本研究室の方々に心より感謝申し上げます。

VI. 参考文献

- 1) 福喜多博義: 核医学技術総論, 山代印刷株式会社, pp 341-350, 2010
- 2) Shikano N, Kanai Y, Kawai K, et al: Transport of $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ via rat renal organic anion transporter 1. J Nucl.Med. 45: 80-85, 2004
- 3) Nakanishi T: Drug transporters as targets for cancer chemotherapy. Cancer Genomics Proteomics 4: 241-254, 2007
- 4) Shikano N, Kawai K, Nakajima S, et al: Transcellular transport of radioiodinated 3-iodo-alpha-methyl-L-tyrosine across monolayers of kidney epithelial cell line LLC-PK₁. Ann.Nucl.Med. 18: 227-234, 2004

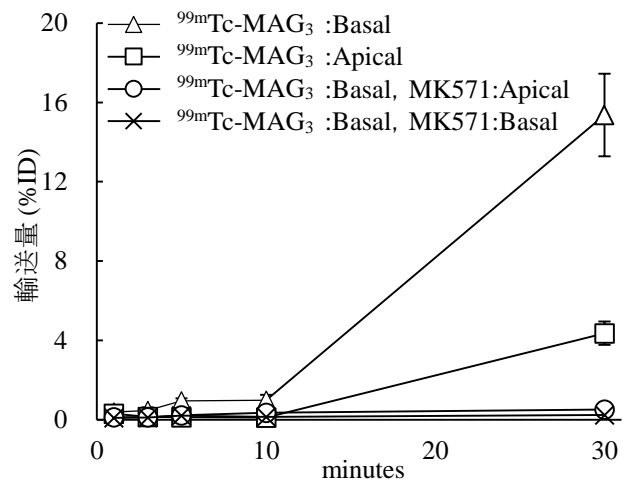


Fig. 3 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の経細胞輸送量

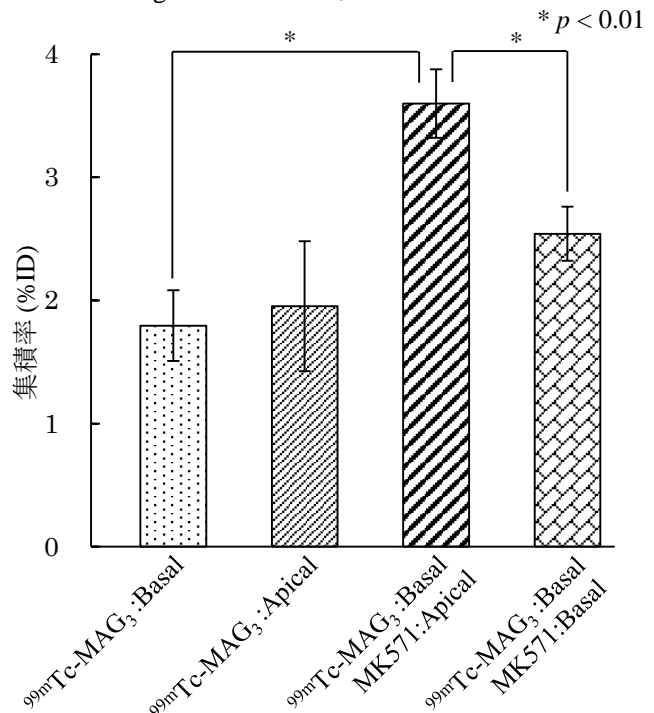


Fig. 4 $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ の細胞内集積率