

# 【3】

氏 名	あ べ とく ろう 阿 部 篤 朗
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第702号
学位授与の日付	平成30年3月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (薬理学)
学位論文題目	Interaction of human renal organic anion transporter OAT1 and OAT3 with flavonoids (ヒト腎臓有機酸トランスポーターOAT1およびOAT3とflavonoidsの相互作用)
論文審査委員	(主査) 教授 杉 本 博 之 (副査) 教授 堀 雄 一 教授 瀬 尾 芳 輝

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【背 景】

食物中のflavonoidsのantioxidant（抗酸化）効果は、虚血性心疾患や糖尿病などの酸化ストレス関連慢性疾患予防の役割と関連して大きな注目を集めている。Flavonoidsは植物界に広く分布し、flavonol、flavanol、flavanone、flavone、anthocyanidin、isoflavoneなどに分類される。

中でもQuercetinはflavonolタイプのflavonoidで、グリコシドとしてユビキタスに存在している。腸管内より吸収されるこのQuercetinを初めとしたflavonoidsのほとんどは抱合型代謝物に変換されて血液循環に入り、最終的には速やかに腎臓より尿中に排泄される。

これまで多くの仕事はこれらQuercetinを初めとした他のflavonoidsの生理機能や有効性のコントロールのための腸管吸収に集中しているが、これらの腎臓における排泄経路に関しては未だわかってはいない。

### 【目 的】

本研究ではflavonoid輸送を抑制することによりその体内のbioavailabilityの調節を目指し、flavonoidの腎排泄の分子機序の解明を目的とする。

### 【対象と方法】

既に我々が樹立している有機酸トランスポーターのOAT1およびOAT3遺伝子安定発現細胞を用いて、それらの代表的輸送基質パラアミノ馬尿酸（PAH）およびエストロン硫酸（ES）の細胞内取込みを、細胞外液中に存在するflavonoidsがどの程度抑制するかを0.01、0.1、1、10、100  $\mu$ Mの濃度を

用いて調べた。

### 【結 果】

- (1) Flavonoidsの体外排泄経路である腎臓の分子実体の解明を目指し、有機酸トランスポーターに着目した。
- (2) 腎臓の有機酸排泄経路として知られる有機酸トランスポーターのOAT1およびOAT3の安定発現細胞を用いて、そのRI標識輸送基質PAHおよびES取り込みのflavonoids存在下での抑制率を調べた。
- (3) FlavonoidsのIC<sub>50</sub>値はflavones (apigenin、luteolin) < flavonols (quercetin、Kaemferol) < flavanone (naringenin) < soflavone (genistein、daidzein) の順であった。
- (4) Quercetinではaglyconeの方がglycosideよりもIC<sub>50</sub>値が小さかった。

### 【考 察】

有機酸トランスポーターOAT1は腎臓でのflavonoidsの排泄経路であることが示唆された。

OAT1発現細胞群では非発現群と比較して、有意にPAHの取り込みが認められた。

### 【結 論】

OAT1阻害薬がquercetinを初めとしたflavonoidsの腎臓での排泄抑制により酸化ストレス関連慢性疾患の治療薬に応用できる可能性がある。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

### 【論文概要】

Flavonoidsは植物に含まれる色素で、構造の違いによりflavonol、flavone、flavanone、isoflavoneの4種類に大きく分類される。このflavonoidsは植物を紫外線から保護する役割を有し、生体内に取り込まれると抗酸化作用を持つと考えられている。Flavonoidsの体内動態に関しては、これまでは消化管からの吸収に関する研究が主であり、小腸上皮細胞において、ナトリウム・グルコース共輸送体(SGLT1)を介した取り込みと抱合代謝が行われることが知られている。一方、有機酸トランスポーター(OAT1、OAT3)は腎近位尿管基底側膜に発現し、有機酸性の薬物(βラクタム系抗菌薬、H<sub>2</sub>ブロッカーなど)や内因性物質(PGE<sub>2</sub>、cAMPなど)を細胞内へ取り込むことが知られている(Anzai N et al., J Pharmacol Sci, 2006)。そこで、本論文ではflavonoidsの体内動態に関して腎排泄経路に注目し、その分子機序にOAT1、OAT3が関与するかを明らかにするために研究を行った。

方法は、共同研究者によって過去に樹立されたヒトOAT1およびOAT3の安定発現細胞株を用い、それぞれのトランスポーターの代表的輸送基質であるパラアミノ馬尿酸(PAH)またはエストロン硫酸(ES)の細胞内への取り込みに対するflavonoidsによる阻害作用の強度を調べることでIC<sub>50</sub>値を求めた。その結果、quercetinとkaemferol(ともにflavonol)、apigeninとluteolin(ともにflavone)、naringenin(flavanone)などのflavonoidsがそれぞれのOATの安定発現細胞によるPAHまたはESの取り込みを阻害した。genisteinとdaidzein(ともにisoflavone)はOAT1安定発現細胞によるPAHの取り込みのみを阻害し、rutin(flavonol)はOAT1やOAT3の安定発現細胞によるPAHおよびESの

いずれの取り込みも阻害しなかった。以上からflavonoidsの種類により、ヒトOAT1とOAT3によるPAHまたはESの取り込みに対する阻害作用の強度が異なることが明らかになった。

#### **【研究方法の妥当性】**

本研究では、ヒトOAT1の安定発現細胞株では $[^{14}\text{C}]$ PAHを、OAT3の安定発現細胞株では $[^3\text{H}]$ ESを用いて細胞内への取り込みとそれらに対するflavonoidsの阻害作用を解析した。この細胞株はマウス近位尿細管セグメント2部分に由来する細胞であり、生体内でOAT1およびOAT3が分布する部位に相当する。そのため、得られた結果は腎近位尿細管分泌の機序に適用できると考えられる。放射性同位元素標識の輸送基質を用いた基質の細胞内への取り込みを評価する方法は、細胞内の放射線量を液体シンチレーションカウンターで測定するという簡便かつ精度の高い手技である。それぞれのflavonoidsの $\text{IC}_{50}$ 値は5用量の結果から既存式を用いて定量的に算出されている。以上から本研究は、実験手技・手法、実験デザイン、データ解析において妥当性があると考ええる。

#### **【研究結果の新奇性・独創性】**

本研究は、化学構造の異なる9種類のflavonoidsについて、腎近位尿細管において有機酸取り込みを担うOAT1およびOAT3との相互作用を検討した。Flavonoidsを網羅的に検討したという点、それぞれの化合物について有機酸トランスポーターに対する $\text{IC}_{50}$ 値を算出したという点で新奇性を認める。Flavonoidsの体内動態としてこれまで明らかにされてこなかった腎排泄経路に注目した点や、ヒトOAT1およびOAT3の安定発現細胞を用いてflavonoidsの腎尿細管分泌を介した分子機序を明らかにしようとした点に独創性が認められる。

#### **【結論の妥当性】**

これまでのヒトを対象としたflavonoidsのバイオアベイラビリティの調査研究から、玉ねぎまたはグレープフルーツジュースを摂取した後の血漿中quercetinまたはnaringeninの濃度は、本論文で得られた $\text{IC}_{50}$ 値に相同である。従って、一部のflavonoidsは生体内で腎近位尿細管に発現するhOAT1あるいはhOAT3への相互作用により有機酸輸送を阻害するという結論は妥当性があると考ええる。

#### **【当該分野における位置付け】**

最近一部のflavonoidsの代謝物はOAT1やOAT3と相互作用し取り込まれる結果が示された。本論文では、flavonoids全般について解析を行い、有機酸トランスポーターと相互作用を示すことを明らかにした。

#### **【申請者の研究能力】**

申請者は、薬理学を学んだうえで、培養細胞を用いた薬物輸送取り込み実験、阻害実験および $\text{IC}_{50}$ 値の算出方法を習得した。これらの経験を通して、申請者は研究遂行に必要な知識や能力は十分に獲得していると判断する。

#### **【学位授与の可否】**

本申請論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該研究分野への貢献度も高いと評価できる。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Dokkyo Journal of Medical Sciences

45 : 27-34, 2018