

## 熊本大学学術リポジトリ

### Kumamoto University Repository System

Title	二次性副甲状腺機能亢進症における薬物動態制御機能タンパク質の発現変動とその分子機構および病態生理解析
Author(s)	杉本, 龍星
Citation	
Issue date	2017-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2298/37121">http://hdl.handle.net/2298/37121</a>
Right	

## 二次性副甲状腺機能亢進症における薬物動態制御機能タンパク質の発現変動とその分子機構および病態生理解析

医療薬学専攻 医療薬科学コース 薬剤学分野 杉本 龍星

慢性腎臓病（CKD）はステージの進行に伴い心血管疾患（CVD）、骨・ミネラル代謝異常（CKD-MBD）および筋力低下等の合併症を発症し、これら合併症発症が生命予後とも関連する。なかでも、CKD-MBDの主要病態である二次性副甲状腺機能亢進症（SHPT）は、血清中副甲状腺ホルモン（PTH）の上昇に加え、リンやカルシウムの過飽和に伴う血管石灰化を介して生命予後を悪化させる。一方、CKDでは腎機能低下に伴い、腎排泄型薬剤の排泄遅延はもちろんのこと、腎外クリアランスも変動することが報告されてきた。この腎外クリアランスの変動に関して、CKD病態下で体内に蓄積する尿毒症物質などの液性因子の関与が一部報告されてきたものの、その詳細は不明であった。このような背景の下、SHPTにおける薬物動態制御機能タンパク質の発現変動とその分子機構および病態生理の解明を目的として、「CKDで観察される腎外クリアランスの変動にPTHが関与する。」という仮説を立て、*in vivo* および *in vitro* の両面から検討を行った。まず、SHPTモデルラットを作成し、SHPTに伴う薬物動態制御機能タンパク質の発現変動について検討した。次に、PTHによる ABCG2 発現制御とその基質である尿酸動態に与える影響について精査し、SHPTで観察される高尿酸血症の分子機構について解析した。さらに、PTHによる CYP3A 発現制御機構の解明を試みた。以下に、得られた知見を要約する。

### (1) SHPTラット肝臓および小腸における薬物動態制御機能タンパク質の発現変動

5/6腎臓摘出ラットに高リン食を給餌することでSHPTラットを作成し、1) Sham群、2) SHPT群および3) PTH分泌抑制作用を持つシナカルセト投与群（SHPT+シナカルセト群）の3群に分けて検討を行った。SHPT群では血清PTHの顕著な上昇に加え、低カルシウムおよび高リン血症を示した。一方、シナカルセト投与は、血清PTHの上昇を有意に抑制し、低カルシウムおよび高リン血症を改善した。各ラットの肝臓から全細胞溶解液と粗膜画分を調製して、CYP3A2、P-gp、MRP2、ABCG2およびOATP4のタンパク質発現量をWestern blottingにより比較検討した。また、各ラットの腸から全細胞溶解液と粗膜画分を調製して、CYP3A2、NaPi-IIb、P-gp、MRP2、ABCG2及びOATP4のタンパク質発現量を比較検討した。その結果、SHPT群において肝CYP3A2および小腸CYP3A2とABCG2タンパク質発現の有意な減少が観察された。一方、SHPT+シナカルセト群では、これらタンパク質の発現減少が抑制された。

### (2) SHPTにおけるABCG2発現抑制と血清尿酸値上昇の分子機構

(1)で得られたSHPTラットにおけるABCG2の発現減少と、SHPT患者で報告されてきた高尿酸血症との関連を明らかにすることを目的として以下の検討を行った。まず、SHPTラットを用いた実験において、SHPTラットでは健常ラットに比べて、血清PTHと血清尿酸値が有意に上昇していた。その際、尿酸の腎クリアランス低下と小腸排泄の低下が観察された。また、腎臓と小腸におけるABCG2の膜発現量が低下していた。これらの現象は、PTH分泌抑制作用を持つシナカルセト投与により抑制された。興味深いことに、血清PTH

と尿酸値の間には有意な正の相関性が認められた。従って、PTH は ABCG2 の発現を抑制することで、血清尿酸値上昇に関与する可能性が示された。次に、ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 細胞を用いて ABCG2 の発現に及ぼす PTH の影響を検討した結果、活性型 PTH (1-34) は ABCG2 の mRNA レベルには変化を与えずに、ABCG2 の細胞膜発現量を有意に減少させた。この作用は PTH 受容体に結合しない不活性型 PTH (13-34) では観察されなかった。さらに、PI3K 阻害剤である wortmannin および膜透過性 cAMP 誘導体である 8-Br-cAMP は Akt のリン酸化を抑制し、引き続いて ABCG2 の細胞膜発現を減少させた。また、protein phosphatase 2A を阻害することで Akt のリン酸化を増加させるオカダ酸処置は、PTH により誘導された ABCG2 の細胞膜発現の減少を抑制した。これらの結果から、PTH による ABCG2 の細胞膜発現制御には、PTH 受容体の活性化に引き続く、cAMP-PP2A-Akt シグナル経路を介した転写後調節機構が重要な役割を果たしていることが示唆された。最後に SHPT 患者を対象とした観察研究による検討を行ったところ、シナカルセト投与により血清中 PTH 濃度と尿酸値が有意に減少し、両者の間には有意な正の相関性が認められた。臨床試験の結果は上述した SHPT ラットの検討結果と良く一致していた。

### (3) SHPT における CYP3A 発現抑制の分子機構

ラット由来初代培養肝細胞および Caco-2 細胞に PTH (1-34) を添加したところ、CYP3A2 および CYP3A4 タンパク質発現量の有意な減少が観察された。この結果は (1) で示した SHPT ラットを用いた検討を支持する結果であった。さらに、Caco-2 細胞を用いた検討において、PTH (1-34) の 6 時間のインキュベーションは CYP3A4 mRNA 発現を減少させたが、PTH 受容体に結合しない不活性型である PTH (13-34) は影響を及ぼさなかった。したがって、PTH (1-34) は PTH 受容体を介して CYP3A4 の発現を抑制することが示唆された。また、8-Br-cAMP が CYP3A4 mRNA 発現を有意に減少させたことに加え、PTH による CYP3A4 mRNA 発現減少作用は、PI3K、NF- $\kappa$ B、PKC および PKA 阻害剤により抑制された。すなわち、PTH による CYP3A4 の mRNA 発現抑制には、PTH 受容体を介した細胞内 cAMP の上昇に伴う PI3K-Akt、NF- $\kappa$ B、PKC および PKA シグナル経路の複数のシグナル経路が関与している可能性が示された。

以上、本研究では CKD で観察される腎外クリアランスの変動に PTH が関与することを明らかにした。特に、SHPT を合併した CKD 患者で観察される高尿酸血症の要因として、PTH による ABCG2 の膜発現低下による尿酸排泄の低下が関与することを見出すとともに、その作用機序として cAMP-PP2A-Akt 経路の関与を明らかにした。また、PTH は CYP3A 発現を低下させることも明らかとなり、その機序として細胞内 cAMP 上昇に伴う複数のシグナル経路の関与を示唆した。さらに、PTH 産生抑制薬であるシナカルセトがこれら PTH 誘発の尿酸排泄低下を間接的に回復するという新たなシナカルセトの作用を見出すと同時に、これまでに報告のない薬物間相互作用を惹起する可能性を示した。本研究成果は、SHPT における薬物動態制御機能タンパク質の発現変動とその分子機構および病態生理の一端を明らかにした。加えて、血清 PTH がこれまで予測ツールのなかった腎外クリアランスの予測因子となり得る可能性も示唆するものであり、今後、さらに臨床試験を積み重ねることで検証していく必要があると思われる。