

薬物腎排泄に関わる有機カチオントランスポータ (OCT) の分子的多様性

浦上裕美子

Molecular Diversity of Organic Cation Transporter (OCT) Mediating Renal Excretion of Drugs

Yumiko URAKAMI

Department of Pharmacy, Kyoto University Hospital, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

(Received July 4, 2002)

Tubular absorption and urinary secretion are important physiological functions for the maintenance of body fluid homeostasis and detoxification of drugs and xenobiotics. The proximal tubular epithelial cells play a principal role in limiting or preventing the toxicity of administered drugs by actively secreting organic cations from the circulation into the urine. Rat(r)OCT2 was identified as a second member of the organic cation transporter (OCT) family and is predominantly expressed in the kidney. In the reverse-transcriptase-polymerase chain reaction of microdissected nephron segments, rOCT1 mRNA was detected primarily in the superficial and juxtamedullary proximal convoluted tubules, whereas rOCT2 mRNA was detected widely in the superficial and juxtamedullary proximal straight tubules and some other nephron segments. The inhibitory potencies of cationic drugs and endogenous cations on the tetraethylammonium (TEA) uptake via rOCT1 and rOCT2 indicates that rOCT1 and rOCT2 have similar affinity for many compounds, although there are moderate differences in the affinity for several compounds, such as 1-methyl-4-phenylpyridinium, dopamine, disopyramide, and chlorpheniramine. On the other hand, there were gender differences in the expression levels of rOCT2, but not of rOCT1, in rat kidneys; both mRNA and protein levels of rOCT2 in the kidneys were higher in males than females. These results suggest that rOCT1 and rOCT2 play distinct roles in the basolateral membranes of renal tubules mediating tubular secretion of cationic drugs.

Key words—Organic cation transporter; renal tubular secretion; tetraethylammonium; basolateral membranes; multispecificity; gender differences

1. はじめに

生体内に投与されたカチオン性 (塩基性) の薬物や代謝老廃物は、最終的に胆汁又は尿中へと排泄される。腎尿細管上皮細胞には基質の荷電状態を識別・輸送する有機カチオン輸送体が発現し、効率的な薬物排泄を営んでいる。^{1,2)} 単離膜小胞や培養細胞を用いた系統的な解析から、³⁻⁷⁾ Fig. 1 に示すような有機カチオン輸送系の存在が提唱されてきた。すなわち、血管側側底膜に局在する膜電位依存性の有機カチオントランスポータ及び管腔側刷子縁膜に局在する H⁺/有機カチオンアンチポータが、経細胞

的な薬物の尿細管分泌を媒介している。有機カチオントランスポータ群の実体解明を目的とした分子レベルでの解析が進展し、⁸⁻¹⁰⁾ 1994年に Koepsellらによってラット有機カチオントランスポータ rOCT1の cDNA がクローニングされた。¹¹⁾ それ以来、有機カチオントランスポータ (OCT) ファミリーとしてラット、ヒトなどから5種類 (OCT1, OCT2,¹²⁾ OCT3,¹³⁾ OCTN1,¹⁴⁾ OCTN2^{15,16)}) のトランスポータ cDNA が同定されている。我々が単離した rOCT2 は、593個のアミノ酸からなる推定12回膜貫通型の糖タンパクであり、主に腎に発現している (Fig. 2)。さらに、rOCT2は rOCT1と同様、有機カチオン輸送系の代表的基質であるテトラエチルアンモニウム (TEA) を膜電位依存的に輸送する。¹²⁾ 本稿では、rOCT2の腎内分布並びに機能特性について、rOCT1と比較しながら述べる。

京都大学医学部附属病院薬剤部 (〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54)

e-mail: yumikou@kuhp.kyoto-u.ac.jp

*本総説は、平成13年度日本薬学会近畿支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

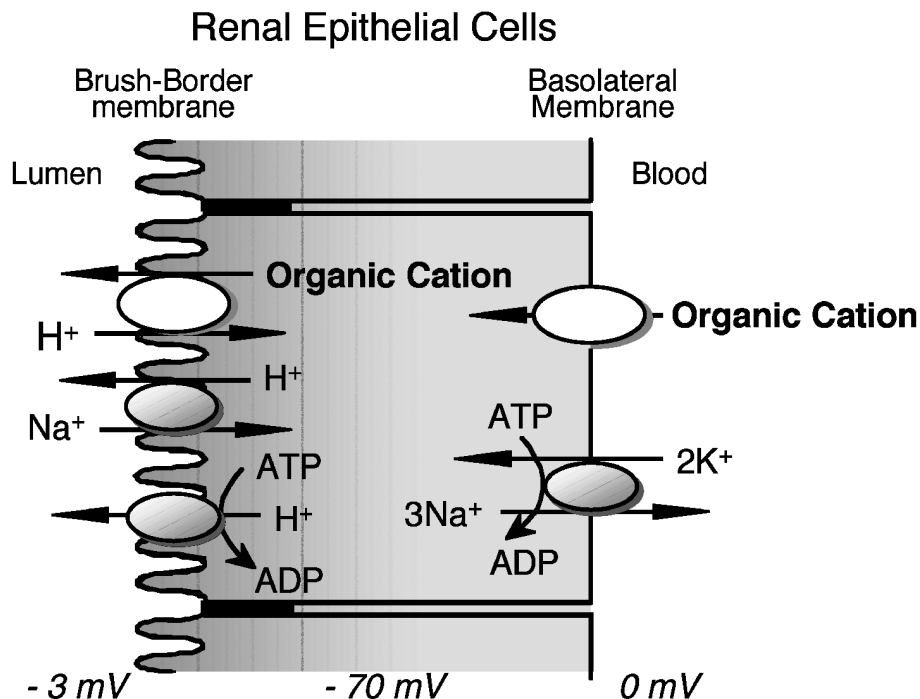


Fig. 1. Renal Tubular Organic Cation Transport System

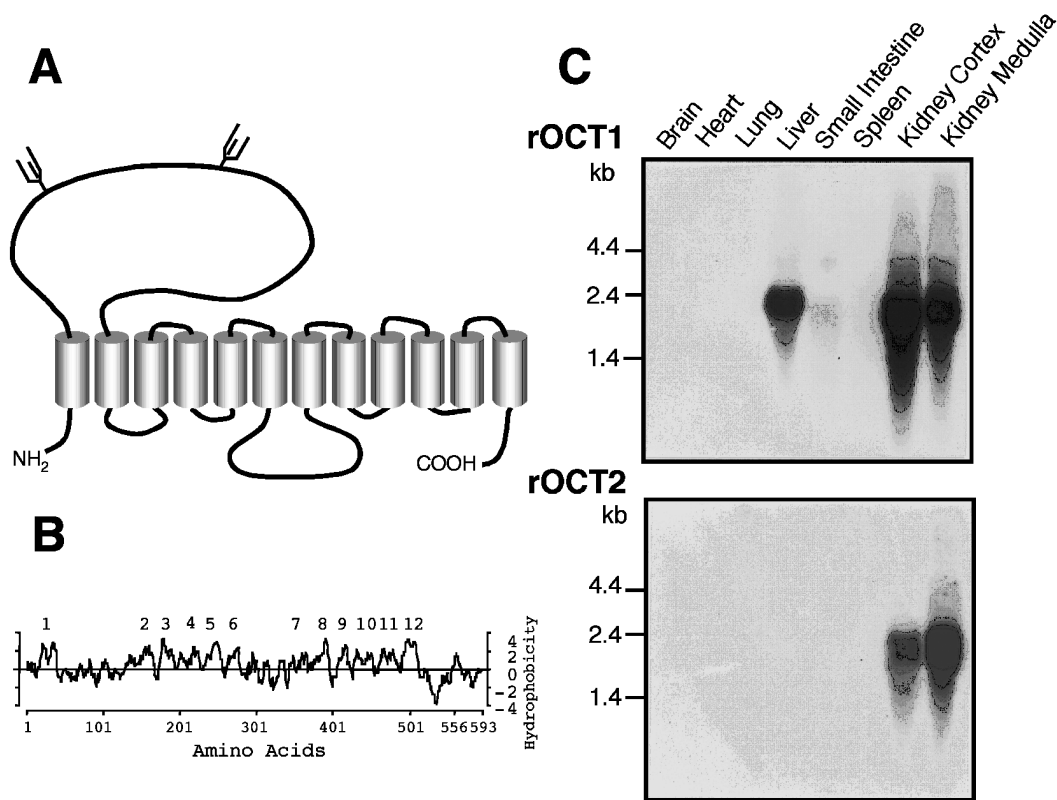


Fig. 2. Predicted Secondary Structure (A) and Hydrophobicity Plots (B) of rOCT2, and Northern Blot Analysis (C) of rOCT1 and rOCT2 mRNA in the Rat Tissues

B: Kyte and Doolittle hydrophathy plots with a window 13 amino acid residues. Numbers between plots indicate putative membrane-spanning region. C: Total RNA (30 μg) from the indicated tissues was run in each lane and hybridization was performed using the rOCT1 and rOCT2 cDNA.

2. ラット腎局在性有機カチオントランスポータ rOCT2 の尿細管分布¹⁷⁾

腎臓の最小単位であるネフロンは形態学的、機能的にいくつかの異なる分節から構成されている。rOCT1 及び rOCT2 の腎内分布を調べるため、ラット腎糸球体及び尿細管の各セグメント (11 分節) を単離し、RT-PCR によって rOCT1 及び rOCT2 mRNA を検出した。その結果、OCT1 mRNA の発現が近位曲尿細管 (PCT) のみに認められたのに対し、rOCT2 mRNA は PCT 及び近位直尿細管 (PST) に加えて髄質太い上行脚 (MAL)、遠位曲尿細管 (DCT)、及び皮質集合管 (CCD) に検出された (Fig. 3)。したがって、rOCT1 及び rOCT2 はいずれも近位尿細管に発現し、カチオン性薬物の尿細管分泌に関与することが示唆された。さらに、rOCT2 の発現は近位尿細管以外にも認められたことから、rOCT2 が薬物の尿細管分泌以外の生理的役割を担っている可能性が考えられた。DCT にはドパミンレセプターが発現し、Na⁺ イオン濃度の調節を担っている。^{18,19)} ドパミンは尿細管でも産生されること、さらに、rOCT2 がドパミンを輸送することから、rOCT2 が Na⁺ イオン濃度の調節に間接的に関与している可能性が示唆される。一方、rOCT1 及び rOCT2 それぞれに対する特異抗体を用いた免疫組織学的解析から、両タンパクが尿細管上皮細胞の側底膜に発現していることが判明した。²⁰⁾

3. rOCT1 及び rOCT2 の薬物認識特性に関する比較解析^{18,21)}

rOCT1 及び rOCT2 の薬物認識特性を比較解析するため、両トランスポータの安定発現系をイヌ腎由来上皮細胞 MDCK を宿主として作成した。両トランスフェクタント (MDCK-rOCT1, MDCK-rOCT2) による TEA の取り込みは、TEA を側底膜側に添加した場合にのみ顕著に上昇した (Fig. 4)。TEA 取り込みの濃度依存性について調べたところ、高濃度において飽和性が観察され、見かけの Km 値は MDCK-rOCT1 及び MDCK-rOCT2 でそれぞれ 38 μ M, 45 μ M であった (Fig. 5)。また、rOCT1 及び rOCT2 は TEA 以外にも神経毒の 1-メチル-4-フェニルピリジニウム (MPP)、シメチジン (H₂ ブロッカー) やグアニジン (内因性代謝物) など、構造的に多様な有機カチオンを輸送することが判明した (Fig. 6)。種々カチオン性化合物の

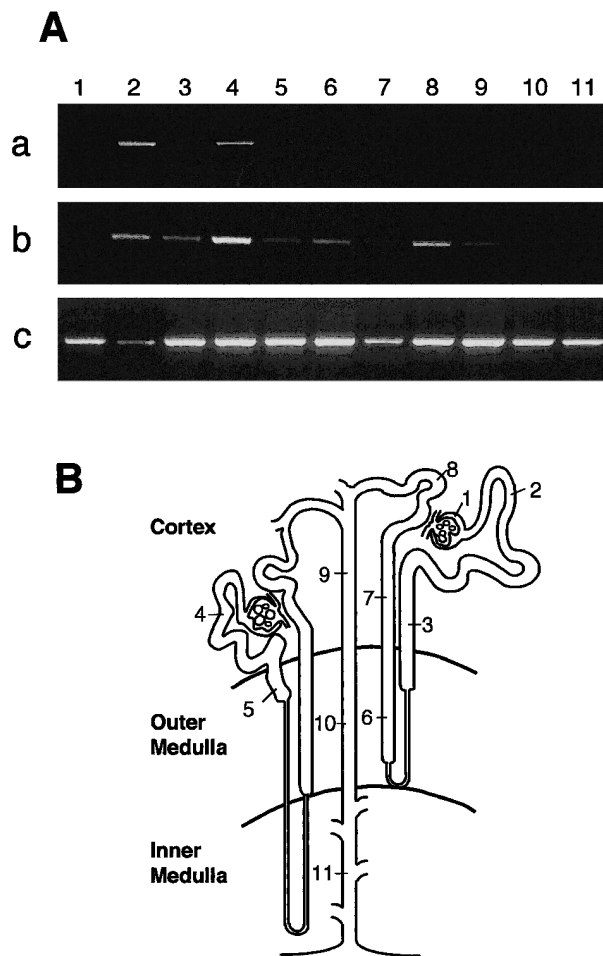


Fig. 3. RT-PCR Detection of rOCT1 and rOCT2 mRNA in Microdissected Nephron Segments

A: PCR amplification was performed using either 5 glomeruli or a 2-mm length of renal tubule. After microdissection, each dissected tubular segment was reverse-transcribed, and the cDNA synthesized was amplified using a set of primers for rOCT1 (a), rOCT2 (b) and GAPDH (c). The PCR products were separated by electrophoresis through 2% agarose gels. B: Schematic illustration of microdissected nephron segments. 1: glomerulus, 2: proximal convoluted tubule (superficial), 3: proximal straight tubule (superficial), 4: proximal convoluted tubule (juxtamedullary), 5: proximal straight tubule (juxtamedullary), 6: medullary thick ascending limb, 7: cortical thick ascending limb, 8: distal convoluted tubule, 9: cortical collecting duct, 10: outer medullary collecting duct and 11: inner medullary collecting duct.

TEA 取り込みに対する共存阻害効果について検討したところ、モノアミン類、内因性カチオン及び抗不整脈剤などのカチオン性薬物の共存下において、TEA 取り込みは有意に低下した。阻害曲線を基に IC₅₀ 値を算出し両者を比較したところ、rOCT1 並びに rOCT2 は多くのカチオン性化合物でほぼ類似の親和性を示したが、MPP、ドパミン、ジソピラミドやクロルフェニラミンなど、一部異なる感受性を有することが明らかとなった (Table 1)。これらの結果から、rOCT1 と rOCT2 は multispecific な基

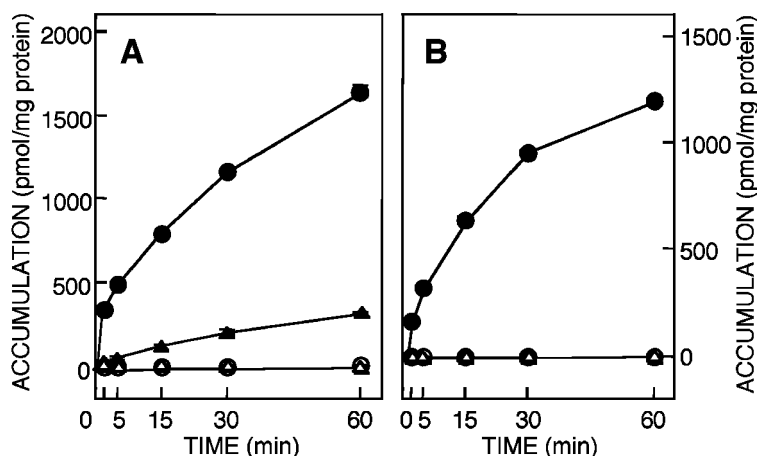


Fig. 4. Accumulation of TEA by Monolayers of MDCK-rOCT1 (A) and MDCK-rOCT2 (B) Cells

Monolayers of MDCK-rOCT1 (●▲) or MDCK-pBK (○△) (A), and MDCK-rOCT2 (●▲) or MDCK-pBK (○△) (B) were incubated for the specified periods at 37°C with 50 μ M [14 C]TEA added to either basolateral (●○) or apical (▲△) side (pH 7.4). Unlabeled incubation medium was added to the opposite side (pH 7.4). After incubation, the radioactivity of solubilized cells was counted. Each point represents the mean \pm S.E.M. of three monolayers.

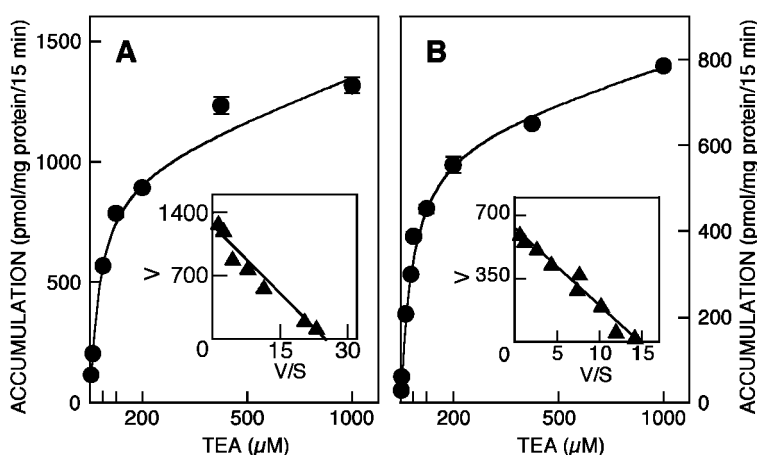


Fig. 5. Concentration Dependence of the TEA Accumulation by MDCK-rOCT1 (A) and MDCK-rOCT2 (B) Cells from Basolateral Side

[14 C]TEA accumulation (●) by cell monolayers was measured at various concentrations (0.01–1 mM) for 15 min at 37°C following addition to the basolateral side (pH 7.4). Unlabeled incubation medium was added to the apical side (pH 7.4). After incubation, the radioactivity of solubilized cells was determined. Insets represent Eadie-Hofstee plots (▲) for each experiment after correction of the nonsaturable component. Each point represents the mean \pm S.E.M. of three monolayers.

質認識特性を有すること、両者は薬物尿細管分泌において一部異なる役割を担っている可能性が示唆された。

4. 腎における rOCT2 発現の性差とその調節因子^{22,23)}

腎における有機イオンの排泄に性差が認められることが報告されているが、^{24,25)} その分子メカニズムについては不明であった。我々は腎有機カチオン分泌の性差における OCT の役割解明を目指し解析を進めた。Figure 7 に示すように、ラット腎切片及び

側底膜小胞への TEA 取り込みは、雄性ラットにおいて雌性ラットよりも有意に高く性差が認められた。そこで、雌雄ラット腎における有機カチオントランスポータ (rOCT1, rOCT2, rOCT3) 発現量に関する検討を行った。その結果、腎における OCT の発現は雄性ラットで高く性差が認められたが、rOCT1 及び rOCT3 についてその傾向は観察されなかった (Figs.8,9)。さらに、雄性及び雌性ラットにテストステロン又はエストラジオールを投与後、rOCT1 及び rOCT2 mRNA の発現変動について調

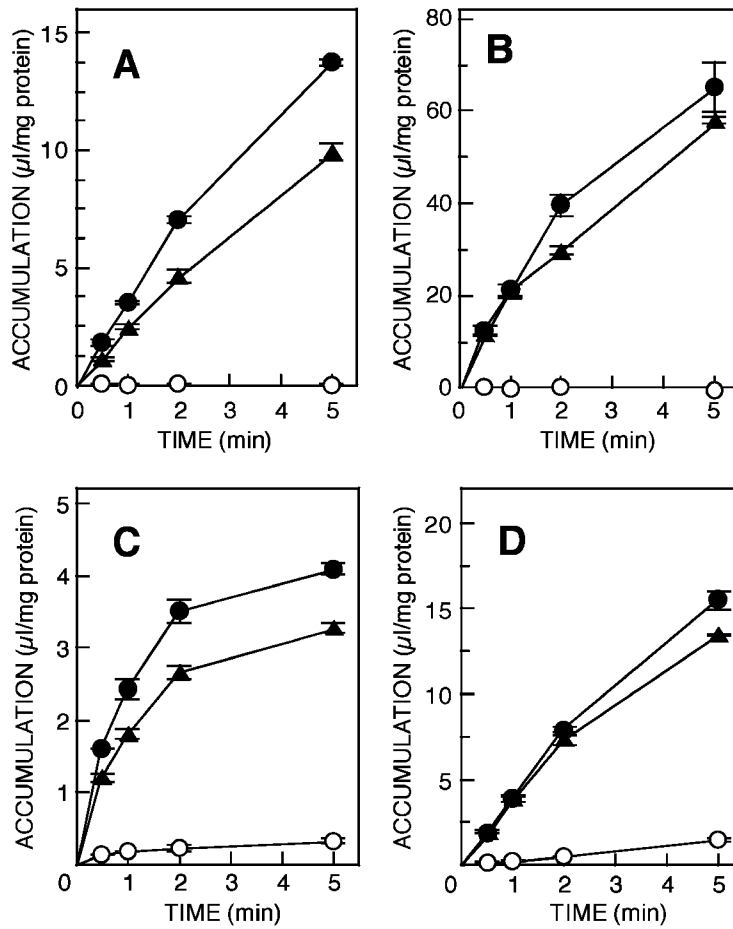


Fig. 6. Uptake of Cationic Compounds by MDCK-rOCT1 and MDCK-rOCT2

Monolayers of MDCK (○), MDCK-rOCT1 (●) and MDCK-rOCT2 (▲) were incubated for specified periods at 37°C with 50 μM [¹⁴C] TEA (A), 100 nM [³H] 1-methyl-4-phenylpyridinium (B), 100 nM [³H] cimetidine (C) or 50 μM [¹⁴C] guanidine (D) added to the basolateral side (pH 7.4). Unlabeled incubation medium was added to the apical side (pH 7.4). After incubation, the radioactivity of solubilized cells was measured. Each point represents the mean ± S.E.M. of three monolayers from a typical experiment.

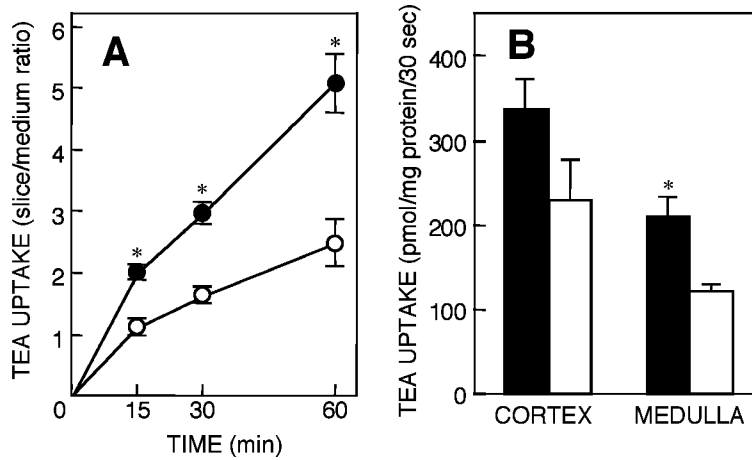


Fig. 7. Accumulation of TEA by Slices (A) and Basolateral Membranes Vesicles (B) Isolated from Male and Female Rat Kidneys

A: Renal slices of male (●) and female (○) rats were incubated at 25°C in buffer containing 50 μM [¹⁴C] TEA for the indicated periods. D- [³H] Mannitol was used to estimate the extracellular trapping and nonspecific uptake of [¹⁴C] TEA. Each point represents the mean ± S.E.M. of three slices from a typical experiment. **p*<0.05, significantly higher than female. B: Basolateral membrane vesicles from cortex and medulla of male (closed column) and female (open column) rat kidneys were incubated with [¹⁴C] TEA for 30 sec at 37°C. Each point represents the mean ± S.E.M. of three separate experiments performed in three determinations. **p*<0.05, significantly higher than females.

Table 1. The IC₅₀ and Apparent Ki Values of Various Organic Cations for [¹⁴C]TEA Uptake by rOCT1 and rOCT2

Organic cations	The IC ₅₀ or apparent Ki (in parentheses) values for [¹⁴ C]TEA uptake (μM)		IC ₅₀ rOCT1/IC ₅₀ rOCT2
	rOCT1	rOCT2	
Tetraalkylammoniums			
Tetrapentylammonium	1.3 ± 0.29	1.7 ± 0.16	0.79
Tetrabutylammonium	7.9 ± 1.4	5.7 ± 0.56	1.4
Tetrapropylammonium	23 ± 3.1	39 ± 0.74 ^{a)}	0.59
Tetraethylammonium	(47)	(52)	0.90
Tetramethylammonium	1138 ± 344	1674 ± 239	0.68
Neurotoxin and monoamines			
1-Methyl-4-phenylpyridinium	(0.77)	(1.7)	0.45
Nicotine	(64)	(50)	1.3
Histamine	324 ± 59 (141 ± 25)	363 ± 108 (171 ± 51)	0.89
Serotonin	897 ± 42 (390 ± 18)	513 ± 5.2 ^{a)} (242 ± 2.5)	1.7
Dopamine	1385 ± 62 (603 ± 27)	733 ± 58 ^{a)} (347 ± 28)	1.9
Adrenaline	3678 ± 156 (1600 ± 68)	2519 ± 618 (1191 ± 292)	1.5
Endogenous cations			
Thiamine	736 ± 70	646 ± 112	1.1
N ¹ -Methylnicotinamide	(669)	(403)	1.7
Choline	1452 ± 108	1450 ± 58	1.0
Guanidine	(724)	(713)	1.0
Antiarrhythmic drugs			
N-Acetylprocainamide	20 ± 3.1 (8.8 ± 1.4)	11 ± 0.63 ^{a)} (5.0 ± 0.30)	1.9
Quinidine	(15)	(19)	0.79
Disopyramide	142 ± 19 (62 ± 8.0)	64 ± 1.3 ^{a)} (30 ± 0.63)	2.2
Procainamide	109 ± 10 (47 ± 4.5)	76 ± 5.2 ^{a)} (36 ± 2.4)	1.4
Cationic drugs			
Imipramine	16 ± 8.2	9.9 ± 1.4	1.6
Amiloride	13 ± 0.60 (6.9 ± 3.6)	13 ± 0.80 (4.7 ± 0.66)	1.1
Cimetidine	(5.7)	(9.4)	0.61
Chlorpheniramine	14 ± 3.2	26 ± 1.8 ^{a)}	0.55
Diphenhydramine	24 ± 0.56	32 ± 2.2 ^{a)}	0.74

The uptake of [¹⁴C]TEA (50 μM) was achieved by adding various concentrations of unlabeled inhibitors to the incubation medium. The apparent Ki values of the inhibitors that *trans*-stimulation effects were observed by were calculated from the IC₅₀ values. The data represent the mean ± S.E.M. of three independent experiments. a) *p* < 0.05, different from the IC₅₀ value of rOCT1.

べた結果、rOCT2 mRNA の発現量はテストステロン投与ラットにおいて亢進し、エストラジオール投与ラットにおいて低下する傾向にあった (Fig. 10). また、性ホルモン投与ラットから単離した腎切片への TEA 取り込みは、rOCT2 mRNA の発現量とほぼ対応した変動を示した (Fig. 11). 以上の結果から、rOCT2 はカチオン性薬物の腎移行に対

して主要な役割を担うこと、ラットにおけるカチオン性薬物の尿中排泄に認められる性差の中心となるトランスポーターであることが示唆された。したがって、今後 rOCT2 の発現制御機構について転写レベルから翻訳レベルまで系統的に解明・整理することは、ヒト腎におけるカチオン性薬物の尿細管分泌能の個人差やその制御機構を明らかにするうえで有用

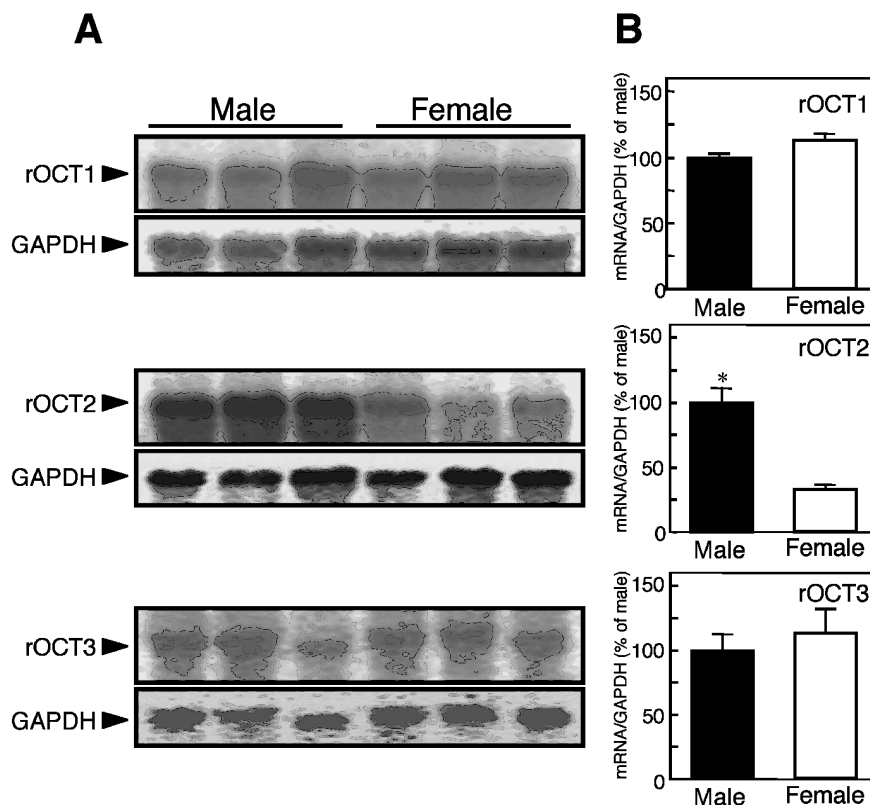


Fig. 8. Northern Blot Analysis of rOCT1, rOCT2 and rOCT3 mRNA in the Kidneys of Male and Female Rats

A: Total RNA (10 μ g) from male and female rat kidneys, hybridized with rOCT1, rOCT2, rOCT3, or GAPDH cDNA probe under high stringency. B: Densitometric quantitation of rOCT1, rOCT2 and rOCT3 were corrected for loading using GAPDH. Male levels were set at 100%. No differences in GAPDH were measured between male and female rats. Each column represents mean \pm S.E.M. of three rats. * p <0.05, significantly higher than females.

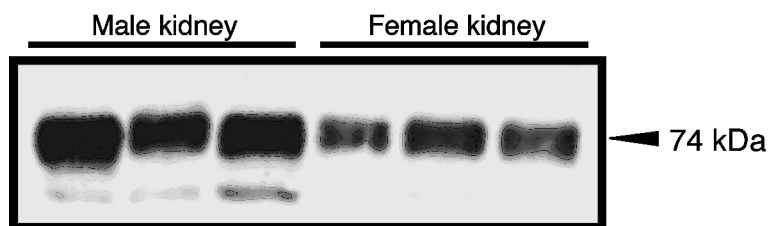


Fig. 9. Immunoblot Analysis of rOCT2 Protein in the Kidneys of Male and Female Rats

Crude membranes (50 μ g) from the kidneys of three male and three female rats, respectively, were separated on SDS-PAGE. rOCT2 was identified using polyclonal antibodies. The arrows indicate the position of rOCT2 protein.

な基礎情報を提供するものとする。

5. おわりに

本研究では rOCT2 の尿細管分布、薬物認識特性並びに腎における rOCT2 発現の性差について検討した。上記以外にも、OCT2 の生理学的・病態生理学的役割が明らかになりつつある。例えば、慢性腎不全の進展におけるカチオン性薬物の腎クリアランスの低下に OCT2 の発現低下が関与することや、²⁶⁾ ヒト腎において hOCT2 が最も強く発現する有機カ

チオントランスポーターであり、カチオン性薬物の腎移行において主要な役割を果たしていることなどが示唆されている。²⁷⁾ 最近では、hOCT2 の alternative spliced variant である hOCT2-A の単離に成功し、薬物の腎排泄に関わる有機カチオントランスポーターの分子的・機能的多様性について実証した。²⁸⁾ 今後、多彩なカチオン性薬物の腎排泄並びに病態時におけるカチオン性薬物の腎挙動を分子的に説明することを目指して研究を続け、今回得られた

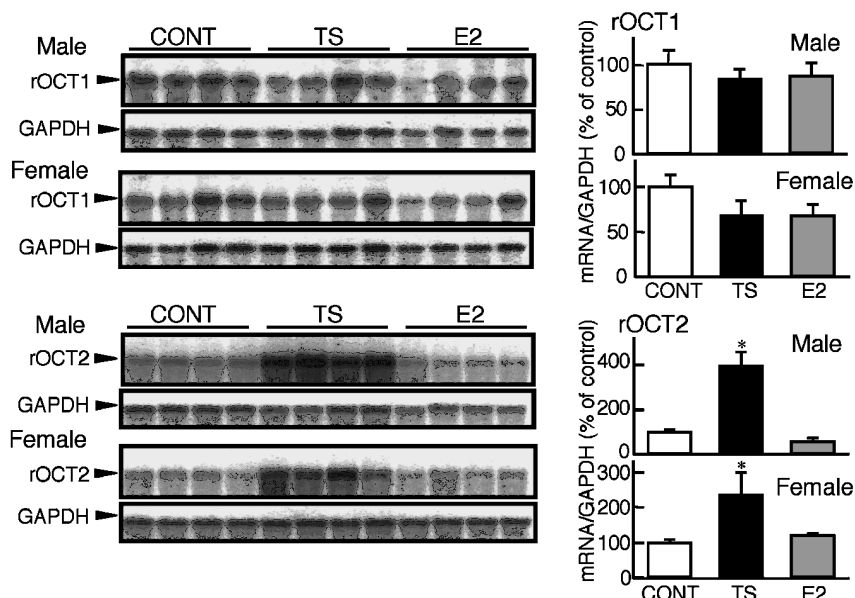


Fig. 10. Northern Blot Analysis of rOCT1 and rOCT2 mRNA in the Kidneys of Male and Female Rats Treated with Testosterone or Estradiol

A: Total RNA (10 μ g) of kidney from rats treated vehicle (CONT), testosterone (TS) or 17 β -estradiol (E2) was hybridized with rOCT1, rOCT2 or GAPDH cDNA probe under high stringency. B: Densitometric quantitation of rOCT1 and rOCT2 were corrected for loading using GAPDH. Control rat levels were set at 100%. No differences in GAPDH were measured among all rats. Each column represents mean \pm S.E.M. of four rats. * p <0.05, significantly different from control.

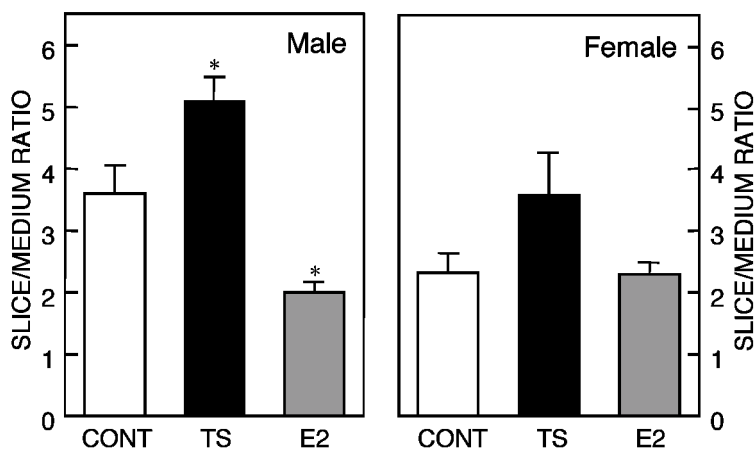


Fig. 11. TEA Accumulation by Kidney Slices from Male and Female Rats Treated with Testosterone and Estradiol

Kidney slices from males and females were incubated at 25°C in buffer containing 50 μ M [14 C]TEA for 60 min. CONT: rats treated with vehicle, TS: rats treated with testosterone, E2: rats treated with 17 β -estradiol. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three separate experiments in three slices. * p <0.05, significantly different from control.

研究成果と共に臨床における薬物治療の適正化・個別化推進の一助となることを期待する。

謝辞 本研究は、京都大学医学部附属病院薬剤部において行われたものであり、遂行に際し終始温かい御指導と御助言を賜りました京都大学教授・医学部附属病院薬剤部長乾賢一先生に心から御礼申し上げます。また直接の御指導を頂きました京都大学

医学部齋藤秀之助教授、奥田真弘講師、増田智先助手に厚く御礼申し上げます。さらに研究遂行にあたり多大な御協力を頂きました薬剤部諸氏に深く感謝致します。なお、本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金（特別研究員奨励費）によって行われたものであり、併せて深謝致します。

REFERENCES

- 1) Pritchard J. B., Miller D. S., *Physiol. Rev.*, **73**, 765–796 (1993).
- 2) Ullrich K. J., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1197**, 45–62 (1994).
- 3) Holohan P. D., Ross C. R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **216**, 294–298 (1981).
- 4) Takano M., Inui K., Okano T., Saito H., Hori R., *Biochim. Biophys. Acta.*, **773**, 113–124 (1984).
- 5) Hsyu P. H., Giacomini K. M., *Am. J. Physiol.*, **252**, F1065–F1072 (1987).
- 6) Inui K., Saito H., Hori R., *Biochem. J.*, **227**, 199–203 (1985).
- 7) Saito H., Yamamoto M., Inui K., Hori R., *Am. J. Physiol.*, **262**, C59–C66 (1992).
- 8) Koepsell H., *Annu. Rev. Physiol.*, **60**, 243–266 (1998).
- 9) Inui K., Okuda M., *Clin. Exp. Nephrol.*, **2**, 100–108 (1998).
- 10) Inui K., Masuda S., Saito H., *Kidney Int.*, **5**, 944–958 (2000).
- 11) Gründemann D., Gorboulev V., Gambaryan S., Veyhl M., Koepsell H., *Nature*, **372**, 549–552 (1994).
- 12) Okuda M., Saito H., Urakami Y., Takano M., Inui K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **224**, 500–507 (1996).
- 13) Kekuda R., Prasad P. D., Wu X., Wang H., Fei Y. J., Leibach F. H., Ganapathy V., *J. Biol. Chem.*, **273**, 15971–15979 (1998).
- 14) Tamai I., Yabuuchi H., Nezu J., Sai Y., Oku A., Shimane M., Tsuji A., *FEBS Lett.*, **419**, 107–111 (1997).
- 15) Tamai I., Ohashi R., Nezu J., Yabuuchi H., Oku A., Shimane M., Sai Y., Tsuji A., *J. Biol. Chem.*, **273**, 20378–20382 (1998).
- 16) Wu X., Prasad P. D., Leibach F. H., Ganapathy V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 589–595 (1998).
- 17) Urakami Y., Okuda M., Masuda S., Akazawa M., Saito H., Inui K., *Pharm. Res.*, **18**, 1528–1534 (2001).
- 18) Connell D. P. O., Botkin S. J., Ramos S. I., Sibley D. R., Ariano M. A., Felder R. A., Carey R. M., *Am. J. Physiol.*, **268**, F1185–F1197 (1995).
- 19) Ibarra F., Aperia A., Svensson L., Eklöf A., Greengard P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 21–24 (1993).
- 20) Sugawara-Yokoo M., Urakami Y., Koyama H., Fujikura K., Masuda S., Saito H., Naruse T., Inui K., Takata K., *Histochem. Cell. Biol.*, **114**, 175–180 (2000).
- 21) Urakami Y., Okuda M., Masuda S., Saito H., Inui K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**, 800–805 (1998).
- 22) Urakami Y., Nakamura N., Takahashi K., Okuda M., Saito H., Hashimoto Y., Inui K., *FEBS Lett.*, **461**, 339–342 (1999).
- 23) Urakami Y., Okuda M., Saito H., Inui K., *FEBS Lett.*, **473**, 173–176 (2000).
- 24) Kleinman L. I., Loewenstein M. S., Goldstein L., *Endocrinology*, **78**, 403–406 (1966).
- 25) Bowman H. M., Hook J. B., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **141**, 258–262 (1972).
- 26) Ji L., Masuda S., Saito H., Inui K., *Kidney Int.*, **62**, 514–524 (2002).
- 27) Motohashi H., Sakurai Y., Saito H., Masuda S., Urakami Y., Goto M., Fukatsu A., Ogawa O., Inui K., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13**, 866–874 (2002).
- 28) Urakami Y., Akazawa M., Saito H., Okuda M., Inui K., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13**, 1703–1710 (2002).