

## P-5-1

### チアジド系類似利尿薬インダパミドによるK排泄増加作用への腎カリクレインの関与

藤田朋恵<sup>1</sup>、安田修一<sup>2</sup>、馬嶋正隆<sup>3</sup>

<sup>1</sup>獨協医科大学薬理学、<sup>2</sup>北里大学医学部遺伝子高次機能解析センター、<sup>3</sup>北里大学医学部薬理学

【背景】チアジド系および類似利尿薬は高血圧治療薬の主要薬の一つである。その作用機序は、遠位曲尿細管でNa-CLトランスポーター阻害によりNa排泄が増加し、下流の接合尿細管でNaおよびKチャンネルを介したNaとKの交換により、最終的にK排泄を伴ってNa排泄が増加すると考えられている。長期使用による重大な有害作用に水電解質のバランス異常がある。腎カリクレインーキニン系は、セリンプロテアーゼの腎カリクレインを律速として接合尿細管以降のNa、KおよびCa排泄を調節することが知られている。【目的】腎カリクレインーキニン系がチアジド系および類似利尿薬による有害作用発現の予測因子になる可能性を考え、同薬の水電解質作用に対する腎カリクレインーキニン系の関与を調べた。

【方法】6週齢、雄性Wistarラットに、カリクレイン阻害薬アプロチニンを一日2回、2.5日(32 mg/kg/回)、あるいはブラジキニン<sub>2</sub>受容体拮抗薬イカチバントを1回(HOE-140、2.4 mg/kg/回)皮下投与後、チアジド系類似利尿薬インダパミド(0.1、0.3 mg/kg)を生理食塩水(4 mL/100g)とともに経口投与した。採尿ケージを用いて6時間蓄尿を行った。電解質排泄量は尿クレアチニン当たりと濾過された原尿のうち尿中に排泄された割合fractional excretion (FE %)として算出した。【結果】アプロチニン併用インダパミド投与により単独投与に比べ、K排泄量、FEKおよび尿量は用量依存性に増加した。血清K濃度およびNa、CLおよびCaの尿中排泄量と血清濃度は変化しなかった。HOE-140併用インダパミド投与では単独投与に比べ、尿量、上記電解質尿中排泄量のいずれも影響を受けなかった。【考察・結論】インダパミドによる尿中K排泄増加作用に腎カリクレインが関与すること、それはB<sub>2</sub>受容体と独立することが示された。血清K濃度が低値を示さなかったことや尿中Na排泄が変化しなかったことは、単回投与のため薬理作用の発現が一時的で、生体として代償されたことが考えられる。腎カリクレイン活性はチアジド系および類似利尿薬による有害作用のうちK排泄増加作用の結果生じる低K血症の個体差の予測因子になる可能性がある。

## P-5-2

### 尿中で検出可能な炎症性マーカー高分子型量Lipocalin 2の同定

藤原葉子、土屋裕義、藤村昭夫、輿水崇鏡

自治医科大学医学部薬理学講座分子薬理学部門

【背景】 Lipocalin 2 (LCN2) は、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) とも呼ばれ、急性腎障害に伴い尿細管での再吸収が障害されると尿中に検出される糖タンパク質である。我々はこれまで、薬剤性腎障害モデルマウスの尿中には、他臓器や血中で検出される従来のLCN2に加え、高分子型量のLCN2が存在することを報告した。本研究では、尿管閉塞や腹腔内の炎症時における尿中LCN2分子種について検討した。【方法】 雄BALB/マウスの左尿管を結紮して回復させた後、閉塞側の腎盂尿および膀胱尿を採取し、ウエスタンブロッティングでLCN2を検出した。尿中LCN2の糖鎖型を糖鎖切断酵素の感受性により推定した。腹腔内炎症モデルはLipopolysaccharide (LPS) 投与により作成した。また、Dexamethasone (DEX) の前投与による炎症抑制効果が尿中LCN2に及ぼす影響を検討した。【結果】 閉塞側の腎盂尿中では、他臓器でも検出される22 kDaのLCN2が顕著に上昇した。この時の膀胱尿では24 kDaのLCN2が検出されたが、この高分子量LCN2は他のいずれの末梢組織でも検出されなかった。LPS投与後の尿中にも2種類のLCN2が検出され、血清、肺、腎臓に存在する22 kDaのLCN2と同様に、endoglycosidase Hによる消化には抵抗性であった。一方、LPS投与マウスの肝臓および尿管組織で検出される22 kDa LCN2は、この糖鎖切断酵素に感受性を示した。DEXの前投与は、LPSによるIL-1 $\beta$  上昇を有意に抑制したが、2種類の尿中LCN2の上昇には影響しなかった。【考察】 尿中高分子量LCN2は糖鎖付加により形成され、腹腔内の炎症反応を敏感に反映する尿中で検出可能な炎症性マーカーと考えられた。

## P-5-3

### ヒト骨髄間葉系幹細胞に対するフルバスタチンとデキサメタゾンの効果

○田邊 耕士<sup>1</sup>、塚越 絵里<sup>1</sup>、三浦 直<sup>2</sup>、吉成 正雄<sup>2</sup>、笠原 正貴<sup>1</sup>

1. 東京歯科大学薬理学講座、 2. 東京歯科大学口腔科学研究センター

【目的】近年、HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチン系薬剤の骨再生能が報告されている。我々もこれまでに、*in vivo*においてスタチン系薬剤の骨再生の効果を検証してきたが、その詳細なメカニズムや至適濃度は十分に明らかにされていない。本研究では、スタチン系薬剤の1つであるフルバスタチンと、骨芽細胞への分化を促進するデキサメタゾンを用いて、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cell: hMSC) に対する効果を検証することを目的とした。

【方法】培養細胞にはhMSC (Cell Applications Inc. USA) を使用し、培地中にフルバスタチンナトリウム (Toronto Research Chemicals, Ontario, Canada) を各濃度 ( $\mu\text{M}$ ) :0 (control)、0.5、1、2、およびデキサメタゾン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を各濃度 (ng/mL) :0 (control)、10、100、1000、をそれぞれ添加し10% FBS- $\alpha$ MEMで培養を行った。2つの薬物が細胞増殖や骨分化に及ぼす影響について、それぞれMTT assay とALP assayを用いて検証した。

【結果および考察】フルバスタチンは、濃度依存性にhMSCの細胞増殖能を減少させた。しかしながら、デキサメタゾン存在下では、フルバスタチンによる細胞増殖能抑制効果が抑えられた。ALP assayでは、デキサメタゾン非添加群で、フルバスタチンのすべての濃度でALP活性の上昇はみられなかった。デキサメタゾン添加群では、各濃度でALP活性を増加させたが、フルバスタチン添加により濃度依存性にALP活性が抑制された。生体においては副腎皮質ホルモンの作用によってフルバスタチンの細胞毒性が緩和されている可能性が示唆された。さらに局所投与により骨再生を効率的に促進させる際には、フルバスタチンを低濃度に維持する必要性が示唆された。

## P-5-4

### 異性化酵素Pin1は慢性骨髄性白血病原因分子BCR-ABLの分解を促進する

塚原富士子、丸 義朗

東京女子医科大学・医学部・薬理学教室

慢性骨髄性白血病原因分子BCR-ABLは、細胞内で強いチロシンキナーゼ活性を発揮し、細胞増殖を促進、アポトーシスを抑制する。我々は、既にBCR-ABL蛋白質の分解系には、2つのユビキチンリガーゼ（CHIPとc-Cbl）が関与することを報告した。CHIPは、蛋白質合成初期の段階で未成熟蛋白質の異常構造を認識するBag1と結合したBCR-ABL蛋白質をユビキチン化して分解を促進する。一方、c-Cblは、成熟後のBCR-ABL蛋白質をリン酸化依存性にユビキチン化して分解を促進する（Blood 2010）。本研究では、さらにプロリン異性化酵素Pin1がBCR-ABLの構造を変化させ、分解を促進する分子として働くことを認めたので報告する。

Pin1の細胞内過剰発現は、Hsp90阻害薬によるBCR-ABL蛋白質の分解を促進した。一方、Pin1阻害薬jugloneは、BCR-ABL蛋白質を安定化した。BCR-ABL分子標的薬であるイマチニブは、ABLキナーゼ領域へ結合することによりBCR-ABL蛋白質を安定化する。Pin1は、イマチニブによるBCR-ABL蛋白質安定化作用を抑制した。Pin1の結合は、BCR-ABL蛋白質のリン酸化依存性に強まり、またBCR-ABLとBag1との結合はPin1存在下で増強した。CHIPによるBCR-ABLの分解は、Pin1により促進されたが、一方c-Cblによる分解は抑制された。

以上の結果から、Pin1は成熟BCR-ABL蛋白質に結合してその構造を崩すことにより、異常構造センサーとして働くBag1による認識を促進し、その結果、CHIPによるBCR-ABL蛋白質のユビキチン化、分解を促進することが示唆される。