S1-15

蛋白質の腎臓尿細管における再吸収機構 ～IL-1 α 誘導体を例として～

大塚製薬(株) 徳島研究所 安全性研究センター

○工藤庄次、後藤浩彦、小富正昭

REABSORPTION OF PROTEINS IN RENAL TUBULES

Shoji KUDO, Hirohiko GOTO and Masaaki ODOMI

Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical CO., Ltd.
463-10 kagasuno Kawauchi-cho, Tokushima 771-01, Japan

【目的】 遺伝子組み換え技術の進展に伴い生理活性蛋白質の量産が可能となり、医薬品としての応用開発が数多く試みられている。蛋白質の生体内動態においては、主に腎臓への顕著な集積がみられ、腎臓が蛋白質の主要な代謝臓器であると考えられている¹⁻⁴⁾。即ち、腎糸球体濾過された蛋白質は尿細管にて再吸収され、lysosomeに移行した後代謝分解され则认为られているが、尿細管における蛋白質の再吸収機序については明らかにされていない。そこで本研究では、遺伝子組み換え型ヒトInterleukin-1 α の誘導体であるOCT-7000(分子量約18,000)を用いて、ラット腎臓尿細管における取り込み動態を免疫電顕法を用いて観察するとともに、OCT-7000の終末尿中排泄に及ぼす各種蛋白質あるいは合成ポリペプチドの影響についても検討し、蛋白質の腎臓尿細管における再吸収機序について考察を加えた。

【実験方法】 免疫電顕法：OCT-7000をSD系雄性ラットに1 mg/kgの用量で静脈内投与した。投与15分後に肝門脈より生理食塩水及び4%PF溶液を注入し全身灌流を行った後、腎臓を摘出し細切した。4%PF及び1%OsO₄で固定後、包埋し超薄切片を作製した。affinity精製したrabbit anti-OCT-7000 antibodyを室温下1時間反応させ、洗浄後、更にgoat anti-rabbit IgG gold conjugate (15nm)を1時間処理した。酢酸ウラン及び鉛染色液で処理した後、日立H-500透過型電子顕微鏡で観察した。 各種蛋白質及び合成ポリペプチドのOCT-7000尿中排泄に及ぼす影響：OCT-7000とhuman serum albumin (MW=67,000, pI=4.7~4.9)、trypsin inhibitor (MW=20,100, pI=4.6)、myoglobin (MW=16,000, pI=6.8~7.2)、trypsinogen (MW=24,000, pI=9.3)、poly-L-glutamic acid (MW_{av.} =13,300)あるいはpoly-L-lysine (MW_{av.} =11,700)とをラットに同時投与(静脈内投与)し、投与後24時間までの尿を採取した。OCT-7000の投与量は一律500 μ g/kgとした。 尿中OCT-7000の測定：尿中OCT-7000の測定には、monoclonal及びpolyclonal抗体によるSandwich ELISA法を用いた。 尿中蛋白質の分析：SDS-PAGEを用いて尿中蛋白質マップについて検討した。また、尿中蛋白質の測定は、ピロガールレッド法を用いた。

【結果】 (1)免疫電顕観察： IgG・金コロイド染色を施した腎臓近位尿細管上皮細胞 (segment II) の電顕像をFig. 1 に示した。金粒子は主にlysosomeにみられ、また管腔側のendosomeおよびその近傍の endocytic vesicleにもその分布が観察された。 nucleus 及びmitochondriaへの分布は認められなかった。

Fig. 1 Immunogold electron microscopic localization of OCT-7000 in epithelial cell of rat proximal tubule

(2)各種蛋白質・合成ポリペプチドのOCT-7000尿中排泄に及ぼす影響： 各種蛋白質あるいは合成ポリペプチドとOCT-7000とを併用投与した時のOCT-7000の尿中排泄率を Table 1 に示した。OCT-7000単独投与後の尿中排泄率は投与量の0.014%と極めて低かった。human serum albumin はOCT-7000の排泄に影響を及ぼさなかったが、trypsin inhibitor、myoglobin 及びtrypsinogen は用量依存的にOCT-7000の排泄を増加させた。各種蛋白質を10mg/kg 併用投与時におけるOCT-7000の尿中排泄率は、単独投与時のそれぞれ13 247 及び442 倍高い値を示した。poly-L-glutamic acidはOCT-7000の排泄増加作用を示さなかったが、poly-L-lysine は用量依存的に増加作用を示した。10mg/kg 併用投与時の尿中排泄率は、単独投与時の762 倍高い値を示した。一方、尿中蛋白質マップの検討においては、myoglobin 100mg/kgとの併用投与時における尿試料において、myoglobin と推定される蛋白質のバンドがみられたが、他の蛋白質あるいは合成ポリペプチドとの併用投与後におけるマップでは、OCT-7000単独投与群を含め、無投与尿のそれと一致しその変動は認められなかった。尿中蛋白質排泄量は0.69～1.40mg/mg CRE であり、OCT-7000と各種蛋白質あるいは合成ポリペプチドとの併用投与は内因性蛋白質の排泄動態に影響を及ぼさなかった。

Table 1 Effects of external administration of proteins or synthetic polypeptides on the urinary excretion of OCT-7000 in rats

Protein or Peptide	excretion of OCT-7000		excretion of urinary proteins	
	ng/mg CRE	% of dose	mg/mg CRE	
(1) OCT-7000				
	1.54±0.61	0.014±0.006	(1)	0.76±0.08
(2) OCT-7000 + human serum albumin				
100mg/kg	1.63±0.50	0.015±0.005	(1.1)	0.87±0.08
(3) OCT-7000 + trypsin inhibitor				
1mg/kg	2.11±0.30	0.018±0.003	(1.3)	0.92±0.14
10mg/kg	19.98±4.74	0.180±0.048	(13)	0.79±0.02
100mg/kg	1,072.2 ±167.1	8.969±1.453	(641)	1.40±0.11
(4) OCT-7000 + myoglobin				
1mg/kg	5.11±2.06	0.048±0.019	(3.4)	0.77±0.07
10mg/kg	351.4 ±58.5	3.462±0.509	(247)	0.82±0.03
100mg/kg	2,741.0 ±334.1	27.679±2.977	(1977)	1.29±0.12
(5) OCT-7000 + trypsinogen				
1mg/kg	61.36±13.99	0.603±0.143	(43)	0.71±0.03
10mg/kg	667.0 ±84.3	6.187±0.830	(442)	0.72±0.03
(6) OCT-7000 + poly-L-glutamic acid				
1mg/kg	0.55±0.14	0.005±0.001	(0.4)	0.74±0.07
10mg/kg	0.60±0.28	0.006±0.003	(0.4)	0.69±0.03
100mg/kg	3.72±1.62	0.036±0.015	(2.6)	0.81±0.11
(7) OCT-7000 + poly-L-lysine				
1mg/kg	21.56±10.07	0.191±0.082	(14)	0.87±0.06
10mg/kg	1,079.9 ±277.3	10.666±2.436	(762)	0.84±0.09

Data are expressed as means of five animals ± SE. CRE:Creatinine.

Results in parentheses indicate the percentage in each treatment group in relation to the group of OCT-7000

【考察】 ラット腎臓におけるOCT-7000の分布を免疫組織化学的手法を用いて検討した結果、OCT-7000は segment 1 または 2 の近位尿細管に分布することが示唆され、また近位尿細管上皮細胞では、endosome、endocytic vesicle 及びlysosomeにその分布が観察された。即ち、腎糸球体濾過されたOCT-7000は刷子縁膜に結合した後、結合膜の陥入を経てendosomeに取り込まれ、更にendocytic vesicle として細胞内に完全に取り込まれたものと考えられた。OCT-7000を貪飲した細胞内endocytic vesicle はprimary lysosomeと融合しsecondary lysosomeを形成したため、lysosome中に高密度のOCT-7000の分布が観察されたものと考えられた。一方、各種蛋白質のOCT-7000終末尿中排泄に及ぼす影響について検討した試験では、併用投与によるOCT-7000の排泄増加がみられ、その作用は poly-L-lysine、trypsinogen、myoglobin、trypsin inhibitor の順に強かった。このことは、併用投与した蛋白質がOCT-7000の尿細管再吸収を阻害したため、OCT-7000が終末尿に排泄されたものと考えられ、その作用はpI値の高い蛋白質ほど強く、またpoly-L-glutamic acidでは排泄増加作用が認められなかったことから、OCT-7000の再吸収過程においてnegative charge が関与しているものと推察された。即ち、近位尿細管の刷子縁膜上にnegative charge を有するbinderが存在するものと推察され、糸球体濾過された管腔内蛋白質とbinderとの結合が蛋白質の再吸収過程における最初の反応であると推察された。以上、腎臓尿細管における蛋白質の再吸収機序として以下のように推察された。①蛋白質の再吸収部位はsegment 1 から 2 の近位尿細管に局在化している。②刷子縁膜上にnegative charge を有するbinderが存在し、糸球体濾過された管腔内蛋白質と結合する。Binderの蛋白質に対する結合特異性は低く、主にchargeによってその結合性が規定される。③結合後、膜の陥入を経てendocytic vesicle として細胞内に取り込まれる。④primary lysosomeとendocytic vesicle とが融合して secondary lysosomeを形成した後、proteaseにより取り込まれた蛋白質は代謝分解される。

【ABSTRACT】 In order to investigate the mechanism of the reabsorption of a protein in renal tubules of rats, we employed OCT-7000, which is a recombinant variant of natural human interleukin-1 α with a molecular mass of approximately 18,000. In this study, OCT-7000 uptake in renal tubules was examined using immunoelectron microscopic technique with immunogold staining. The effects of various proteins or synthetic polypeptides on the urinary excretion of OCT-7000 were also investigated. Immunoelectron microscopic observations showed that OCT-7000 was taken up into the endocytic vesicle close to the brush border membrane located in segment 2 of the proximal tubules, followed by accumulation of secondary lysosomes. Urinary excretion of OCT-7000 after systemic administration was extremely low, accounting for 0.014% of the dose. Human serum albumin had no effect on the excretion of OCT-7000, while increases in the urinary excretion of OCT-7000 were found in rats treated with a trypsin inhibitor, myoglobin and trypsinogen, in a dose-dependent manner. The order of potency for urinary excretion of OCT-7000 was trypsinogen > myoglobin > trypsin inhibitor. Poly-L-lysine, a synthetic polypeptide dose-dependently increased the urinary excretion of OCT-7000, whereas poly-L-glutamic acid had no effect on excretion. Specifically, the data reveal that reabsorption of OCT-7000 in the proximal tubules was inhibited by trypsinogen, myoglobin, trypsin inhibitor or poly-L-lysine, resulting in an increase of urinary excretion of OCT-7000. Furthermore, it was considered that negative charges on the brush border membrane in the proximal tubules were involved in the reabsorption of OCT-7000 because the inhibitory potency of proteins or synthetic polypeptides on the reabsorption of OCT-7000 was increased with a high isoelectric point. From the above, the mechanisms of reabsorption of protein in renal tubule are speculated as follows. (1) The reabsorption site of proteins is located in segment 1 and/or 2 of the proximal tubules in the kidneys. (2) Binders with negative charges likely exist on the surface of the brush border membrane, glomerular filtrated proteins are bound to the binder. The binder has an unusually broad binding specificity for filtered proteins, and the binding affinity between them is involved in only molecular charges. (3) After binding of filtered proteins to the binder on the membrane, the membrane invaginates into the cell, and then the endocytic vesicle including filtered proteins is incorporated into the cell. (4) Primary lysosome and endocytic vesicle are fused to constitute a secondary lysosome.

【REFERENCES】

- 1) S. Kudo et al., *Cancer Res.*, 50, 5751-5755 (1990).
- 2) S. Kudo et al., *Jpn. Pharmacol. Ther.*, 21, 4011-4026 (1993).
- 3) S. Kudo et al., *Jpn. Pharmacol. Ther.*, 21, 3141-3148 (1993).
- 4) S. Kudo et al., *Jpn. Pharmacol. Ther.*, 21, 3163-3172 (1993).