

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・ 分布・排泄動態評価系の開発

所属 金沢大学 薬学部
研究者 辻 彰

分担研究者

- | | |
|---------------|--------|
| (1) 金沢大学薬学部 | 玉井 郁巳 |
| (2) 金沢大学がん研究所 | 佐々木 琢磨 |
| (3) 徳島大学医学部 | 宮本 賢一 |

要 旨

薬物の消化管吸収、組織分布、排泄過程に關与する担体介在輸送の解析とその実体解明を試みた。本研究で得られた成果は、今後の医薬品開発戦略に新しい考え方を付与すると同時に、臨床的な薬物間相互作用等による体内動態変動要因の特定に結びつくものである。

1. 研究目的

組織細胞膜に発現するトランスポーター群は、輸送の多様性によって生体に「必要なもの」を細胞内に取り込み、「不要なもの」を細胞外に排出するという選別輸送をする機能を持つ。この生体膜輸送機構の詳細を明らかにし制御することができれば、本来生体異物である薬物の薬効を最大限に発揮させ、毒性を最小限にする道が開かれる。主任研究者は、薬物の消化管吸収、腎・肝排泄、血液脳関門透過、組織分布過程にトランスポーターが關与することを提唱し、その実証研究を行ってきた。その結果、小腸吸収上皮細胞においてはオリゴペプチドトランスポーターがβ-ラクタム抗生物質、ACE阻害剤、バルシクロビル
の吸収およびモノカルボン酸トランスポーターが弱酸性薬物の吸収に寄与しているのを、それぞれトランスポーターの実体であるPepT1およびMCT1の遺伝子クローニングと、その機能解析により実証することに成功した。さらに脂肪酸のβ-酸化に重要な役割を演じるカルニチンを細胞内に輸送するカルニチントランスポーターOCTN2のクローニングを行い、このOCTN2の遺伝子変異が全身性カルニチン欠損症の原因になっていることを世界に先駆けて発見した。

本研究では主任研究者の従来の研究基盤に基づいて、薬物などの体内動態特性において、細胞膜透過が単純拡散というよりはむしろ特異的トランスポーターの關与によって説明できる場合について着目し、その過程に含まれるトランスポーターの重要性評価を行うとともに、關与するトランスポーター分子の実体解明を試みた。本研究の特色は、臓器が比較的
低分子の薬物を特異的あるいは非特異的に認識し、取り込み、蓄積あるいは排除する多様な生体反応機構を解明し、その機構に基づいて体内動態評価系を構築することにある。本研究の独創的な点は、得られた知見を基盤としてトランスポーターが介在する薬物の体内動態を目的遺伝子欠損動物を用いて解析し、これを生理学的薬物速度論に統合し、さらに拡張してこれを合理的に制御する手法を開発することをねらっている点がある。本研究の完成によって薬物動態に及ぼすトランスポーターの意義が明確になり、それによって合理的な医薬品の分子設計の提言、そして臓器選択的標的化を指向したトランスポーターが介在する薬物動態評価システムの開発が可能になる。

2. 研究手法

1) 消化管吸収実験：ヒト大腸癌由来Caco-2細胞膜透過、ラットまたはウサギ小腸切片をUssing chamberに装着した小腸透過、およびラット腸管内投与による実験を行った。

2) 薬物の脳移行機構：血液脳関門輸送評価はラット脳毛細血管内皮初代培養細胞、ラット脳毛細血管内皮不死化細胞RBEC1、ラット脳灌流法を用いた。さらにP-糖蛋白質をコードする遺伝子*mdr1a, 1b*ダブルノックアウトマウスを用いた*in vivo*実験を行った。

3) ヒトNPT1はヒト成人腎cDNAライブラリーからPCR法により単離した。

4) ヒトOCTN1,2はそれぞれヒト胎児肝臓ならびにヒト腎臓のcDNAライブラリーより既にクローニングしたものを用いた。マウスOCTN遺伝子はヒトOCTN遺伝子配列を元にし、マウス腎臓cDNAライブラリーを鋳型としたPCR法によってクローニングした。本解析中で、ヒトOCTN1あるいはOCTN2とはやや異なるクローンが見いだされ、マウスOCTN3とした。

5) ヒト小腸オリゴペプチドトランスポーターhPEPT1 cDNAを哺乳動物細胞発現ベクター (pcDNA3)

にサブクローニングし、リポフェクタミン法によりHeLa細胞のトランスフェクションを行い、hPEPT1安定発現細胞株(HeLa-hPEPT1)を選択した。同様に空のベクターでトランスフェクションを行いG418耐性コロニー(HeLa-pcDNA3)を単離し、陰性対照細胞として用いた。HeLa-hPEPT1細胞におけるhPEPT1 mRNAの発現はRT-PCRによって確認した。これら安定発現細胞のペプチド性抗がん剤バスタチン取り込み活性について検討を行った。

6)ヌードマウス(Balb/c nu/nu)の背部皮下にHeLa-hPepT1もしくはHeLa-pcDNA3を移植し腫瘍を形成させ、腫瘍へのバスタチンの移行量を測定した。腫瘍の移植による血管透過性や組織間スペースの変化は ^{14}C イヌリンを用いて検討した。

7)組織分布性はRT-PCR法ならびにウェスタン解析により行った。

8)ウェスタン解析のための抗体は、各OCTN1-3のC末端ペプチドをエピトープとした抗ペプチド抗体を作製した。

9)種々化合物の細胞への取り込みは、細胞懸濁液を一定時間後シリコンオイルを重層したマイクロチューブに採取し、遠心により細胞を分取後、放射活性を測定した。

10)HT-1080細胞、ヒト胃がん細胞NUGC-3を用いて、培養液中にCNDAC、2'-deoxy-2'-methylene-1- β -D-arabinofuranosylcytosine (DMDC)、1- β -D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C)、ECyd、EUrdを添加し、継代時に薬剤濃度を上昇されることで、耐性細胞を樹立した。

11)MTT法による薬剤感受性と ^3H 標識されたヌクレオシドの細胞内取り込み量、リン酸化酵素活性は経時的に測定し、耐性化との関連性を検討した。

12)esNTに特異的な吸着性を示すNBMPRの ^3H 標識体を用いて、細胞膜上のesNTを定量化した。またヒトesNTに対する特異的な抗体を用いて、耐性細胞でのesNT発現及び細胞内局在性を検討した。NTの発現様式は ^3H 標識されたヌクレオシドの細胞内取り込みにおける阻害実験によって検討した。

13)ヒトLAT1 cDNAをプローブとして、ヒト胎盤由来のゲノムライブラリーをスクリーニングし、ヒトLAT1遺伝子構造を決定した。ヒトLAT1ゲノムよりエクソン1を同定し、転写開始点の決定をprimer伸張法にて同定した。また、さまざまなサイズをもつ転写調節領域DNA断片をルシフェラーゼ発現ベクターに組み入れ機能解析ベクターを構築した。さらに、転写調節機構を検討するためRBEC1細胞、ヒトT細胞、CHO細胞にそれぞれトランスフェクトし、発現調節部位を調べた。

14)LAT1の補助因子であるヒト4F2hc遺伝子構造を決定し、転写開始部位を上述した方法で同定した。さらに、さまざまなサイズをもつヒト4F2hc遺伝子転写調節領域DNA断片をルシフェラーゼ発現ベクターに組み入れ機能解析ベクターを構築後、上述した各種細胞にトランスフェクトし転写機能を測定した。

3. 研究成果

1)小腸上皮細胞モノカルボン酸輸送機構

短鎖脂肪酸、乳酸あるいはニコチン酸のような弱酸性化合物の消化管吸収には酸性pHで増大するpH依存性が観測される。このpH依存性に対し、主任研究者らは単純拡散の他に、モノカルボン酸トランスポーターMCT1がプロトンとモノカルボン酸の共輸送に関与していることを主張してきた。一方、主任研究者らは種々モノカルボン酸系化合物の、プロトンあるいは重炭酸イオン勾配存在下における、ウサギ小腸刷子縁膜小胞への初期取り込みは、プロトン勾配あるいは重炭酸イオン勾配それぞれの存在下で初期取り込みに促進があることを報告した。興味深いことにモノカルボン酸構造を有する高脂血漿治療薬のプラバスタチンや、その部分構造を形成するメバロン酸にはプロトンとの共輸送系を介した輸送が起こるが、アニオン逆輸送系に対しては殆ど親和性を持たないという結果が得られた。このような両輸送機構の基質認識性の違いは、アニオン交換輸送系がプロトン共輸送系とは独立した機構として存在することを示唆している。本研究では、モノカルボン酸輸送に関与するアニオン交換輸送系の特性と、プラバスタチンおよびメバロン酸に共通して存在する水酸基に着目し、水酸基を有する種々モノカルボン酸化合物の輸送を測定することによって、モノカルボン酸輸送系の特徴を明らかにすることを目的とした。

1-1)消化管アニオン交換輸送系の基質認識・輸送特性

ヒト消化管上皮細胞のモデルとして繁用されているCaco-2細胞を用いてまず、L-乳酸の透過性を重炭酸イオン勾配条件下で測定したところ、単一の飽和性を示し、アニオン交換輸送系阻害剤DIDSによって透過は有意に阻害された。この条件下ではアニオン交換輸送系のみが比較的純粋に観察できると思われた。また、このL-乳酸の透過は、2-, 4-および5-ヒドロキシモノカルボン酸によって阻害されたが、メバロン酸を含め3-ヒドロキシモノカルボン酸による阻害は認められなかった。さらに、2位、3位あるいは4位に水酸基を有する酪酸を基質とし、それぞれのCaco-2細胞透過性を観察したところ、2-あるいは4-ヒドロキシ酪酸は高濃度で透過速度が頭打ちになる飽和性を示したのに対し、3-ヒドロキシ酪酸の透過速度は飽和性を示さなかった。また、2-あるいは4-ヒドロキシ酪酸の透過はDIDSによって阻害されたが、3-ヒドロキ

シ酪酸の透過は阻害されなかった。

これらの結果から、2-,あるいは4-ヒドロキシ、そしておそらく5-ヒドロキシモノカルボン酸はアニオン交換輸送系によって基質として認識輸送されるが、3-ヒドロキシモノカルボン酸はアニオン交換輸送系の基質になりにくく、3位の水酸基とトランスポーター蛋白質との水素結合などを介した相互作用が基質認識性に重要であることが示唆された。

1-2) モノカルボン酸の立体選択的輸送特性

薬物の薬理作用や毒性、さらには生体内動態において、光学異性体間で異なる挙動を示すことがしばしば観察されている。薬物の吸収に関与している消化管のトランスポーター蛋白質は、薬物とレセプターの関係のように基質の光学異性を比較的厳密に区別することが期待され、光学異性体間で消化管吸収になんらかの差が認められればトランスポーターが介在する透過機構が存在することのひとつの証明になり得るものと考えられた。そこで、Caco-2細胞などを用い、L-およびD-乳酸を基質として選択しその消化管吸収における光学選択性について検討した。また、その他の光学活性なモノカルボン酸の透過についても検討し、選択性を示すモノカルボン酸の構造上の特性について検討した。

pH勾配条件下におけるCaco-2細胞を用いたL-およびD-[¹⁴C]乳酸の透過には、明らかに立体選択性が認められ、低濃度(1 μM)ではL-体の透過速度はD-体の約2倍の値を示した。濃度依存性の速度論的解析によって、L-乳酸の透過はD-体に比べて高親和性であり低容量であることが示された。このことは、比較的低濃度領域においてはL-乳酸の方が効率的に吸収され、高濃度領域ではD-体がより速く吸収されることを示唆している。

Caco-2細胞におけるL-乳酸の透過は、2-ヒドロキシ、あるいは2-アルコキシモノカルボン酸によって立体選択的に阻害され、しかもそのすべてにおいて乳酸のL-体に相当する(S)-体がより強い阻害作用を示したが、その他の光学活性なカルボン酸の阻害作用には立体選択性は観察されなかった。この現象はpH勾配条件の無い、炭酸水素イオン勾配のみの条件においても観察された。また、(S)-および(R)-マンデル酸自身を基質とした透過の検討においても光学選択性が観察されたが、(S)-および(R)-2-フェニルプロピオン酸の透過には立体選択性は認められなかった。

これらの結果から、立体選択的な透過や阻害作用を示すためには、カルボン酸の2位に水酸基、あるいはアルコキシ基を有することが必須であることが示唆され、また(S)-体のほうが(R)-体よりもトランスポーターに対する親和性が高いことが示された。水酸基の酸素原子は水素結合などを介して他の分子の水素原子と相互作用することが知られており、モノカルボン酸の2位の水酸基がトランスポーター蛋白質と相互作用することにより、光学選択的な輸送特性を示すものと考えられた。

ラットおよびウサギの小腸組織を用いた試験では、Caco-2細胞を用いた検討と同様にトレーサーレベルのL-乳酸の透過速度はD-体よりも高かった。また、ラットin situループ法を用いた試験において、様々な濃度の乳酸をループ内に注入し15分後の吸収率を速度論的に解析した。その結果、L-およびD-乳酸の輸送特性には飽和性と非飽和性のコンポーネントが存在し、飽和性を示す過程のK_t値はCaco-2細胞を用いた光学選択的な輸送の検討とほぼ同様な結果が得られ、L-乳酸はD-体に比べ高親和性であり、かつ低容量であることがin situにおいても示された。このin situループ法におけるL-乳酸の吸収率は、投与薬液のpHを高くすることや代謝阻害剤、DIDSの添加によって有意に阻害され、in situの条件においてもプロトン勾配と炭酸水素イオン勾配を駆動力とする少なくとも2種類のトランスポーターが吸収に関与している可能性が示唆された。またin situの検討においてもCaco-2における検討と同様に、L-乳酸の吸収率はL-/D-乳酸および(S)/(R)-マンデル酸のような2-ヒドロキシカルボン酸によって立体選択的に阻害されたが、(S)/(R)-2-フェニルプロピオン酸の阻害においては、選択性は認められなかった。

このように、消化管吸収における立体選択性の検討や、さらにその光学選択性を示す基質の構造的特徴を明らかにすることは、トランスポーター介在型の透過機構が存在することのひとつの証明になり得るものである。またin situループ法を用いた検討によってもトランスポーターが介在する吸収過程を観察することは可能であり、おそらくin vivoの環境においても、モノカルボン酸の消化管吸収には恒常的にトランスポーターが寄与しているものと思われる。

2) キノロン系抗菌薬の血液脳関門トランスポーターによる中枢移行性制御

キノロン系抗菌薬の中には組織移行性は高いが、特異的に中枢移行性が低い誘導体が存在する。そのひとつが、grepafloxacin (GPFX)である。本研究ではGPFXのほかlevofloxacin (LVFX), ofloxacin (OFLX), sparfloxacin (SPFX)のニューキノロン系抗菌薬の脳移行制限に対するBBB排出輸送機構の関与についてBBBモデル細胞として用いたラット脳毛細血管内皮不死化培養細胞RBEC1およびラット脳灌流法を用いて検討を行った。

RBEC1に対するGPFX、SPFXおよびLVFXの取り込み量は5 mMの非標識体存在下で増大した。GPFX

のラット脳灌流法によって求められた見かけの血液脳関門透過速度は $[^{14}\text{C}]\text{GPFX}$ のみ ($0.78 \mu\text{M}$) の値 ($10.9 \pm 1.76 \mu\text{l}/\text{min}/\text{g brain}$) に比べ、非標識体 (2 mM) の共存により有意に増加した ($74.3 \pm 12.0 \mu\text{l}/\text{min}/\text{g brain}$)。これは、非標識体の存在により排出輸送系が阻害されたためと推察される。したがって、ニューキノロン系抗菌薬の脳移行制限にBBBにおける何らかの排出輸送系が関与していることが示唆された。

2-1) P-gpの関与

BBBに存在する排出輸送系であるP-gpの関与を調べるために、P-gpをコードする遺伝子を欠損した *mdr1a, 1b* 欠損マウスを用いて検討した。その結果、GPFXおよびSPFXの非結合形脳/血漿間分配比 ($K_{p,f}$) は正常マウスに比べて *mdr1a, 1b* 欠損マウスでそれぞれ3および4倍増加し、両化合物の血液脳関門透過にP-gpの関与が示された。

2-2) P-gp以外の排出機構の関与

非標識体による阻害効果をもっとも大きかったGPFXを基質として、ニューキノロン系抗菌薬のBCECからの排出に関与するP-gp以外の排出輸送系の関与について検討した。GPFXは解離定数が $\text{p}K_{a1}$ (カルボキシル基) = 7.1、 $\text{p}K_{a2}$ (2級アミン) = 8.8 であるため、 $\text{pH } 7.4$ 条件下では両性イオン形で存在する。よって、GPFXはアニオンおよびカチオン両方の性質を有すると考えられる。そこで、RBEC1におけるGPFXの定常状態の取り込みに対するアニオンおよびカチオン性薬物の影響を検討したところ、多くのアニオン性薬物により取り込みが増大した。したがって、これらの薬物がGPFXのBCECからの排出を阻害していることが示唆された。また、アニオン交換輸送阻害剤であるDIDSにより取り込みが増大した。これは通常、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送系などのアニオン交換輸送阻害剤として用いられていることから、GPFXのBCECからの排出に Cl^- や HCO_3^- が影響を及ぼしていることが考えられた。そこで、GPFXの定常状態の取り込みに対するこれら無機アニオンの影響を検討したところ、 Cl^- のみを除去しても取り込みは増加しなかったが、 HCO_3^- を除去すると取り込みが有意に増大した。 HCO_3^- 非存在下においてDIDSの効果は認められず、その取り込み量は HCO_3^- およびDIDS存在下におけるそれと同程度まで上昇した。したがって、DIDSは HCO_3^- 感受性の輸送系を阻害し、GPFXの取り込みを増大させていたことが示唆された。また、 HCO_3^- 非存在下において阻害剤の影響はほとんど消失した。なお、 HCO_3^- の有無による取り込みの変化は、 pH の変化によるものではなくイオン自身による効果である結果を得ている。

以上の結果から、GPFXのBCECからの排出に HCO_3^- が関与していることが示唆された。この現象を *in vivo* でも観察してみたところ、 $[^{14}\text{C}]\text{GPFX}$ のみの時と比べて 1 mM DIDS存在下や HCO_3^- 非存在下でGPFXの脳移行量がそれぞれ約2倍、約2.6倍増加し、 HCO_3^- 非存在下およびDIDS存在下で約3.3倍増加した。したがって、 HCO_3^- 感受性の排出輸送系の関与が実証された。

以上の結果から、GPFXのBCECからの排出にはP-gpのみならず、 HCO_3^- 感受性の排出輸送系が関与していることが示唆された。

2-3) MRPの関与

GPFXがMRP1の基質になることがHL60とMRP過剰発現細胞HL60/ADMへの取り込みの比較によって明らかにできたので、GPFXの脳移行制限に対するMRP1の関与について検討を行った。MRP familyは現在7つのメンバーが存在するが、そのうちBBBにはMRP1とMRP5が存在すると報告されているが、本研究でBBBモデル細胞として使用しているRBEC1および初代培養ラット脳毛細血管内皮細胞 (primary rat BCEC) におけるMRP1の有無をRT-PCR法を用いて検討した。ポジティブコントロールである肝臓だけでなくRBEC1および初代培養ラット脳毛細血管内皮細胞 BCECにおいて394 bpのバンドが検出された。RTを行わなかったものについてはバンドが確認されなかった。したがって、RBEC1およびBCECにおいてMRP1の発現が確認された。また、MRPの基質であるmethotrexateやvincristineのRBEC1への取り込みが代謝阻害剤存在下で増加した。この結果はmethotrexateやvincristineのATP依存的な排出が阻害されたためと思われる。また、vincristineの定常状態の取り込みがMRP阻害剤であるgenistein存在下で増加した。したがって、RBEC1においてMRP1が機能していることが示唆された。以上の結果より、GPFXの脳移行制限にMRP1も関与していることが示唆された。

2-4) MRPとアニオン感受性輸送との関連

GPFXの脳への取り込みがアニオン交換輸送阻害剤DIDS存在下や HCO_3^- 非存在下で増加し、*mdr1a, 1b* 欠損マウスを用いた検討から、P-gpの基質となることが明らかとなった。また、HL60およびHL60/ADMを用いた検討から、MRP1の基質となることも明らかとなった。したがって、GPFXの脳移行がP-gpやMRPによって制限されていることが示された。 HCO_3^- やアニオン交換輸送阻害剤の効果はP-gpと異なるものであることはすでに示されている。しかし、MRPとの関係についてはまだ検討されていない。そこで、HL60とHL60/ADMを用いて HCO_3^- の効果がMRPを阻害した結果かどうか検討した。

GPFXのHL60とHL60/ADMへの取り込みはDIDS存在下で減少し、 HCO_3^- 非存在下で変化しなかった。

MRP1の基質である ^3H daunorubicinのMRP過剰発現細胞HL60/ADMからの排出は HCO_3^- 非存在下でやや阻害されたが、HL60との差は大きいままで、 HCO_3^- の欠如がMRPによる排出を阻害する効果は小さいことが明らかとなった。これらの結果より、アニオン交換輸送阻害剤DIDS存在下や HCO_3^- 非存在下における取り込みの増加はMRP1とは異なる排出輸送系が阻害されたためであろうと思われる。

以上の結果から、ニューキノロン系抗菌薬の脳移行制御にはP-gpのみならず HCO_3^- 感受性の排出機構およびMRP1を含む複数の排出輸送系が関与していることが示唆された。

3) 薬物の腎尿細管上皮細胞刷子縁膜有機アニオン輸送系の特定

腎尿細管には代表的有機アニオンであるp-aminohippuric acid (PAH)を輸送する有機アニオン輸送系が存在することが古くから知られていたが、近年、尿細管上皮細胞側底膜に発現する有機アニオントランスポーターOAT1がその分子の実体であることが明らかとなった。しかし、刷子縁膜における有機アニオントランスポーターの実体は未だ明らかにされていない。そこで本研究においては、既に主任研究者らが示唆してきた無機リン酸トランスポーターNPT1が腎尿細管上皮細胞刷子縁膜の存在する有機アニオントランスポーターとして機能しているとの仮説を実証することとした。

既にアニオン性化合物であるbenzyl penicillinやペネム系抗生物質faropenemがNPT1の基質として輸送されることを報告したが、本検討では、PAH輸送におけるヒトNPT1の寄与について検討を行った。ヒトNPT1を発現させたHEK293細胞への ^3H PAHの放射性標識体は、 K_m 2.66 mMの飽和性取り込みを示し、uric acid, benzyl penicillin, faropenem, indomethacin, probenecid, salicylic acid, DIDSなどの有機アニオンによる阻害剤効果を受けた。 ^{14}C uric acid, ^{14}C benzyl penicillin, ^{14}C faropenem, ^3H estradiol-17 β -glucuronide, および ^{14}C indomethacinのヒトNPT1発現HEK293細胞への取り込みは発現バクターのみの細胞への取り込みに比べて有意に高く、これらはヒトNPT1の基質となることが明らかとなった。NPT1は腎尿細管上皮細胞刷子縁膜に発現することを既に明らかにしているが、PAH輸送はナトリウム依存性を示さず、輸送の方向性は細胞内から管腔中への方向と考えられ、NPT1は刷子縁膜における有機アニオントランスポーターの一つとして位置づけられる。

4) マウスOCTNファミリーの解析

申請者等が1997年に世界に先駆けて見いだしたヒトOCTNトランスポーターについてマウスでの分子同定並びに基本機能解析を行った。OCTNトランスポーターは既に有機カチオンあるいは有機アニオントランスポーターであるOCTおよびOATファミリーと共に30%程度の相同性を有する。

OCTNファミリーメンバーとしてヒトにおいては2種類(OCTN1およびOCTN2)であったが、マウスにおいては3種類(OCTN1, OCTN2, OCTN3)が見いだされた。それぞれGenBankTMに、AB016257, AB015800, ならびにAB018436として登録した。遺伝子配列から、それぞれ553, 557および564アミノ酸残基から構成されると推定された。OCTN間での相同性は70%以上であった。

組織分布性は、RT-PCR解析の結果、いずれも腎臓および精巣に発現することがわかった。OCTN1ならびにOCTN2は他に肝臓や筋肉など多くの組織で検出された。一方、OCTN3の分布は腎臓と精巣に検出され、特に精巣には高い発現を示した。ウェスタン解析による結果においてもほぼRT-PCR解析で得られた結果と対応するものであった。

さらに、カルニチンならびにTEAについて、トレーサー濃度の両化合物の各OCTN発現細胞への取り込みを測定した。OCTN非発現細胞への取り込みに比べ、OCTN2ならびにOCTN3は高い活性でカルニチン取り込み増加を示した。一方、OCTN1を発現させたカルニチンの取り込みは有意に増加するものの、その増加はわずかであった。一方、TEAの取り込みはOCTN1ならびにOCTN2で顕著に増加したが、OCTN3による有意な取り込み増加は観測されなかった。即ち、OCTN2はカルニチンならびに有機カチオン輸送の両活性を有するが、OCTN1およびOCTN2はそれぞれ有機カチオンおよびカルニチン取り込みに対して特異性を有するものと考えられた。

ヒトOCTN2を介するカルニチン取り込みは、顕著なナトリウム依存性を示す。そこでマウスメンバーについてもナトリウムイオン依存性を測定した。ナトリウムをN-メチルグルカミンで置換し取り込み実験を行った。その結果、OCTN1ならびにOCTN2は有意なナトリウムイオン依存的カルニチン取り込み活性を示した。一方、OCTN3を介するカルニチン取り込みは全くナトリウムイオン依存性を示さなかった。従って、OCTN3が有する特異性の高いカルニチン取り込み活性は、OCTN2の示すそれとは全く異なるメカニズムで生じるものと考えられた。

さらに、OCTN2およびOCTN3によるカルニチン取り込みの濃度依存性を検討した。Eadie-Hofstee解析の結果いずれも一相性を示した。また、得られた K_m 値はそれぞれ22 μM および3 μM であり、いずれも高親和性カルニチントランスポーターであることがわかった。同様にOCTN1およびOCTN2を介したTEA

輸送のKm値はそれぞれ452 μ Mならびに216 μ Mと求められた。それぞれヒトOCTN1およびOCTN2で得られた結果と同程度であり、ヒトならびにマウスOCTN1,2は類似した機能特性を有するものと考えられた。

カルニチン輸送活性を示したOCTN2ならびにOCTN3について、カルニチン輸送に対する阻害効果からその基質選択性を検討した。阻害剤として、アシルカルニチン類や γ -ブチロバタインのようなカルニチン類似化合物、ならびに有機カチオン性物質を用いた。その結果、カルニチン類似化合物では、OCTN3においてより強い阻害活性が得られたが、TEAやコリンなど有機カチオンに分類される化合物によっては、OCTN2においてより高い阻害活性が得られた。従って、TEAならびにカルニチン取り込み活性の差が見られたように、OCTN3の基質選択性はカルニチン特性が高いものであった。

5) がん細胞膜トランスポーターをターゲットとした化学療法の最適化

がん組織への抗がん性物質の標的化は化学療法にとって重要なファクターである。本研究の目的は抗がん剤の細胞内移行の律速段階である細胞膜透過性を促進し、かつ特異性をもたせる「がん組織細胞膜に高い選択性を有する薬物輸送トランスポーター分子をターゲットとした、新しいがん組織ターゲティング法」を開発することにある。正常組織における発現が限局しているペプチドトランスポーターが一部のがん細胞にも発現することから、本研究期間内においては、ペプチドトランスポーターを過剰発現する腫瘍を作製し、担がんマウスを用いてin vivoでのペプチド性抗がん剤の移行性が上昇するかを検討した。

5-1) hPEPT1を過剰発現するモデル腫瘍の樹立

hPEPT1を過剰発現させたモデル腫瘍HeLa-hPEPT1の 3 H]ベスタチン取り込みはHeLa-pcDNA3と比較して約5倍に増加した。その取り込みは非標識グリシルサルコシンおよび非標識ベスタチンの共存により有意に低下した。更に 14 C]グリシルサルコシン取り込みに対するベスタチンによる阻害効果も検討したところIC50値約0.56 mMが得られた。この値はhPEPT1を発現する小腸モデル細胞Caco-2の示すベスタチンのKm値0.34 mMとよく一致した。これらの結果からhPEPT1を過剰発現する腫瘍細胞株を樹立できたと考えられた。

5-2) In vivoにおけるペプチドの腫瘍への蓄積

In vitroでみられたhPEPT1の過剰発現によるペプチド取り込みがin vivoでも再現されるかを担がんマウスを用いて検証した。担がんマウスにベスタチンおよび 14 C]イヌリン同時投与し30分後の組織対血漿中濃度比(Kp値)は、HeLa-pcDNA3移植により形成した腫瘍については、筋肉と比べると高い傾向にあったがほぼ 14 C]イヌリンの値と同程度であった。それに対してHeLa-PEPT1移植により形成した腫瘍では、ベスタチンのKp値が約2.0と顕著な上昇がみられた。この値は 14 C]イヌリンのKp値(約0.5)と比べ有意に高いことから、ベスタチンが腫瘍細胞内に取り込まれていることが示された。In vivo実験においては代謝の影響も考えられたので、血中でより安定であると考えられる 3 H]カルノシンをモデル化合物として用いた検討を行った。その結果 3 H]カルノシンを用いてもKp値約2.5が得られ、in vivoにおけるHeLa-hPEPT1腫瘍のペプチド性化合物輸送が再現された。

5-3) ベスタチンの腫瘍増殖抑制効果

hPEPT1が過剰発現することによるHeLa細胞のベスタチンに対する感受性の変化をMTT法により検討した。HeLa-pcDNA3については、検討を行ったベスタチン濃度(0.22~222 μ g/ml)でほとんど細胞増殖速度が変化しなかったのに対して、HeLa-hPEPT1については2.2 μ g/ml以上の濃度において顕著な増殖抑制効果がみられた。In vivoにおける感受性を検討する目的で、担がんマウスにベスタチンを28日間毎日1回の経口投与(0.5 mg/kg)を行った。その結果、HeLa-pcDNA3を移植形成させた腫瘍組織では腫瘍増殖抑制効果が認められなかったのに対し、HeLa-hPEPT1移植により形成させた腫瘍では、腫瘍体積が生理食塩水を投与した群に対して約5分の1程度となり顕著な腫瘍増殖抑制効果が認められた。

以上の結果よりペプチドトランスポーターを介した腫瘍組織へのドラッグデリバリーが可能であることが示された。

6) 抗腫瘍性シトシンヌクレオシド耐性細胞の樹立および初期耐性化機構の解析

HT-1080の耐性細胞(HT-1080/CNDAC, HT-1080/Ecyt, HT-1080/EUrd)を作製し初めて10代目以内に数倍の耐性度が観察され、リン酸化される酵素が異なる薬剤の間でも交差耐性が示された。同時期のヌクレオシドの細胞内取り込み量は親株と比較して約1/5~1/10に低下していたが、リン酸化酵素の活性は変化していなかった。 3 H]標識されたNBMPRを用いて、細胞膜上のesNTを定量化した結果、親株(Bmax = 451 fmol/mg protein)に比べ耐性細胞では1/10以下(4.2~40 fmol/mg protein)に減少していた。さらにウエスタンブロット法によっても耐性細胞でesNTの減少が確認された。免疫学的染色法によりesNTは親株では細胞質と細胞膜上が染色されたが、耐性細胞ではわずかに細胞質が染色されただけにすぎなかった。その後継代を続けると、ヌクレオシドの細胞内取り込み量は減少したままだったが、リン

酸化酵素の活性低下に伴い急激な上昇が観察された。

NUGC-3の耐性細胞 (NUGC-3/AraC, NUGC-3^ΔCNDAC, UNGC-3/DMDC, NUGC-3/ECyd, NUGC-3/EUrd) についても同様の検討を行った。NUGC-3の耐性細胞でも作製し始めてから20代目までには全ての耐性細胞で数倍の耐性を観察した。同時期のヌクレオシドの細胞内取り込み量はHT-1080の耐性細胞で観察された様な減少は認められなかった。また、親株の細胞膜上のesNTはHT-1080の耐性細胞と同程度しか発現していなかった。その後HT-1080の耐性細胞と同様にリン酸化酵素の急激な減弱が観察され、それに伴い耐性度も上昇した。しかし、リン酸化酵素の異なる薬剤に対して交差耐性は示さなかった。

HT-1080細胞のヌクレオシドの細胞内取り込み量はNBMPRの存在下で著しい減少を観察した。NBMPRの阻害効果はNUGC-3細胞で認められなかったが、Na⁺非存在下での細胞内取り込み量は75%の減少を観察した。つまり、ヌクレオシドの細胞内取り込みにはNUGC-3細胞ではNa⁺依存性NTが、HT-1080細胞ではesNTが主に寄与していることを明らかにした。

7) LAT1および4F2hc遺伝子の転写領域の解析

7-1) LAT1 遺伝子のRBEC細胞における発現機能

ヒトLAT1遺伝子は約30 kbにまたがり、10のエクソンより構成されていた。また、エクソン・イントロンの境界はGC/AGであった。RBEC細胞におけるLAT1 遺伝子の発現機能を検討するために、ルシフェラーゼアッセイを行った。LAT1 遺伝子転写開始点上流LAT-A(-2.1kb)、LAT-B(-1.1kb)、LAT-C(-0.9kb)、LAT-D(-0.72kb)、LAT-E(-0.4kb)、LAT-F(-0.35kb)、LAT-G(-0.3kb)、LAT-H(-0.1kb)、LAT-I(pGL3-Basic Vector)を含む、レポーターベクターを構築し、RBEC細胞にトランスフェクション後、24時間培養し、プロモーター活性を測定した。その結果、プロモーター活性の上昇は、LAT-AからLAT-Gに見られた。また、LAT-Cにおいて最も活性の上昇が見られた。

7-2) LAT1 遺伝子のT細胞およびCHO細胞における発現比較検討

LAT1遺伝子の発現を比較検討するためにT細胞およびCHO細胞を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。LAT1 遺伝子転写開始点上流A(-2.1 kb)、B(-1.1 kb)、C(-0.9 kb)、D(-0.72 kb)、E(-0.4 kb)、F(-0.35 kb)、G(-0.3 kb)、H(-0.1 kb)、I(pGL3-Basic Vector)を含む、構築したレポーターベクターを用い、各種細胞にトランスフェクション後、48時間後にプロモーター活性を測定した。その結果、LAT-A,B,Dに誘導は見られたが、RBECで見られる強い発現はLAT-Cには見られなかった。よって、ヒトLAT1 遺伝子の転写開始点上流の-0.9 kb to -7.2 kbの範囲に、RBEC細胞特異的な発現に必要な転写因子が存在すると考えられた。

7-3) 4F2hc 遺伝子の各種培養細胞における発現機能

ヒト4F2hc遺伝子を同定し、各種サイズのプロモーター領域を含むクローンを作成し機能解析を行った。RBEC細胞に発現させ組織特異的な発現に必須の領域を調べた結果、4F2hc遺伝子のイントロン1を含む、約-1.5kbにおいて強い転写活性化領域が確認できた。しかしながら、同様の転写促進活性は、T細胞およびCHO細胞においても見られた。よって、4F2hc遺伝子のRBEC細胞特異的な領域は確認できなかった。

4. 考 察

本研究では、キノロン系抗菌薬について、P-糖蛋白質やアニオン交換輸送系など数種のキノロン系抗菌薬に共通して脳外排出に機能していることを見いだした。これは血液脳関門において一つの化合物に対して複数の排泄型トランスポーターが働くことを示した最初の例となった。

一方、モノカルボン酸については従来よりpH分配仮説に従う単純拡散によって膜透過機構が説明されてきた。種々モノカルボン酸の消化管における輸送特性を培養上皮細胞モデルであるCaco-2、ラットまたはウサギ小腸切片を用いて検討した結果、光学異性体間で異なる輸送特性が見られたことから、有機アニオン交換輸送系およびプロトン共輸送系等の特殊輸送系が存在することが確認された。

また、腎尿管上皮細胞刷子縁膜における有機アニオン系薬物の除去にリン酸トランスポーターNPT1が関与することを示すことができた。NPT1は、生理的には尿中のリン酸をNa⁺と共輸送によって尿細管上皮細胞内に上り坂輸送で取り込むが、同時にNa⁺非依存的に細胞内の様々な有機アニオンを尿中に排出する多機能性トランスポーターであることを示唆することができた。主任研究者らが1998年に世界で初めてクローニングしたカルニチントランスポーターOCTN2が、生体に必須なカルニチンを尿中から腎尿管上皮細胞内に再吸収すると同時に、細胞内の異物である有機カチオンの尿中への分泌に働く多機能性トランスポーターであることを発見している。NPT1とOCTN2は生理的物質の維持と生体異物の排除とがシンクロナイズした生体防御機構の一部として機能している可能性が考えられた。

マウスより新たにクローニングした3種類のOCTNメンバーについて解析を行った結果、二種類はヒト

OCTN1ならびにOCTN2とそれぞれ高い相同性を有していること、ならびにカルニチンおよびTEA取り込み活性が類似していることから、ヒトのOCTNのオルトログと考えられた。それらの組織分布性はヒトのそれとはやや異なり、発現する組織が比較的限られていた。マウスで見いだされヒトで見いだされていないOCTN3は非常に精巢特異性の高い発現パターンを示す独特の組織分布性を示した。従って、ヒトにOCTN3が存在しないと仮定した場合、マウスの各メンバーの組織分布性が狭いことは、3種類のOCTNがそれぞれ異なる組織分布性を示すことにより、相互に機能を補っているものと考えられた。さらに機能特性については、OCTN1ならびにOCTN2はひとのそれと非常に類似していた。しかし、マウスOCTN3は、OCTN1あるいはOCTN2と異なり、ほとんど有機カチオン認識性を持たないカルニチン特異性の高いものであった。さらに、カルニチン輸送活性はOCTN2に特異的なナトリウムイオン依存性を全く示さない独特の活性発現機構を有するものと考えられた。これまでの研究成果として、OCTN2は一次性的の全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子であることが明らかになっている。特に、OCTN2遺伝子変異を持つ、全身性カルニチン欠乏症モデル動物であるJVSマウスにおいては著しいカルニチンの全身クリアランス増加が見られることから、糸球体濾過を受けたカルニチンの再吸収に極めて重要な役割を果たしているものと考えられる。これに対して、OCTN1あるいはOCTN3の役割は現時点では明かではない。しかし、OCTN3は精巢特異的な発現が見られることから、精子形成等に関わっていることが考えられる。実際に精巢は生体で最もカルニチン高い蓄積性が見られる組織であり、そういったカルニチン組織分布と関わっている可能性がある。さらに、精子の運動性はカルニチンにより影響を受けることも示唆されており、精巢あるいは精巢上体でカルニチン代謝等に関わっているものと考えられる。一方、OCTN1はカルニチン輸送活性を示すものの、その活性は弱いものであったが、有機カチオン輸送活性は最も高かった。従って、OCTN1については生理的役割は明かではないが、有機カチオン輸送に関わっている可能性が高く、薬物動態的には重要である可能性がある。興味深いことに、OCTNファミリーは、OATやOCTのような有機アニオンならびに有機カチオントランスポーターファミリーと相同性を有する。それぞれアニオン性ならびにカチオン性薬物の腎排泄や胆汁中排泄、さらに血液脳関門や胎盤透過などに関わっていることが示唆されており、両性イオンであるカルニチン輸送に働くOCTNと併せて、有機イオン性化合物輸送をそれぞれ分担している可能性がある。現時点では、トランスポータータンパク質構造と機能との関連解析は容易ではないが、このように構造的に類似性を有するトランスポータータンパク質の比較により、トランスポーターの基質選択性を規定する構造的特徴が見いだされる可能性がある。同様のことはマウスOCTNファミリー内でも言える。即ち、非常に高い相同性を有するが、カルニチンならびに有機カチオン認識性およびカルニチン輸送におけるナトリウムイオン要求性がマウスOCTN1、OCTN2、およびOCTN3の間で著しく異なった。

さらに、ヒト小腸オリゴペプチドトランスポーターhPEPT1遺伝子が良好に機能する腫瘍細胞株の樹立に成功した。In vivoでもペプチドトランスポーターの発現が亢進した腫瘍へペプチド性抗がん剤の集積がおこるかを担当マウスを用いて検討したところ、腫瘍細胞内にカルノシンおよびベスタチンが移行していることが示されたことから、これらのペプチド性化合物が発現したhPEPT1により取り込まれたものと考えられた。

分子機構論的解析によって得られた結果に基づいた、速度論的体内動態解析も一部進行させた。このようなトランスポーターの薬物動態的重要性の定性的のみならず定量的評価への発展が、医薬品開発および医薬品の適正使用においても極めて重要である。

HT-1080細胞の抗腫瘍性シトシンヌクレオシドに対する初期耐性化機序はesNTの発現低下による細胞内移行量の低下であり、NUGC-3細胞では耐性化の主な機序はリン酸化酵素の活性減弱であることが示され、両者の耐性機序の違いは親株に発現しているNTの相違によると考えられた。esNTは細胞の生育環境に応じてその発現量が変化し、細胞の防御機構を担う重要なNTであることが明かとなった。また、NTの発現様式が異なった細胞でもリン酸化酵素の活性減弱が高度耐性化にとって必須要因であることが示された。

血液脳関門細胞における中性アミノ酸トランスポーターであるLAT1遺伝子発現に必要な部位は、転写開始点上流-900bpから-720であり、この領域には様々な転写因子結合配列の存在が示唆された。とくに、アルコールにより誘導される転写因子ADRや様々なストレスにより誘導されるHSFの結合配列が多く見られた。このような結果は、いろいろな外的刺激によりLAT1遺伝子が誘導可能であることが考えられ、血液脳関門における中性アミノ酸輸送系を介する薬物の選択的な輸送能を高めることが可能であると考えられた。一方、4F2hcの発現は、調べたほとんどの組織で発現されており、その特異性を遺伝子プロモーター配列と機能からは、同定できなかった。つまり、血液脳関門における中性アミノ酸輸送を担うLAT1および4F2hc遺伝子における組織的発現特異性は、LAT1遺伝子によつて決定されると考えられた。

5. 結 論

本研究では、既に分子の実体が明らかにされたトランスポーターを中心に、薬物の消化管吸収、組織分布、ならびに体外への排泄過程に関与すると考えられる担体介在輸送特性の解析とその実体解明を試みた。その結果、従来単純拡散による膜透過で説明されてきた種々化合物の体内動態が、トランスポーターを介した細胞膜透過を含むことが示された。本研究で見いだされたものは、小腸、血液脳関門で機能するモノカルボン酸トランスポーターMCT1や多剤排出型トランスポーターP-糖蛋白質、アニオントランスポーターのNpt1やMRP2、さらに有機カチオントランスポーターの一種OCTNトランスポーターである。いずれも、内因性物質のみならず、その基質認識性に依じて何らかの薬物も認識し、細胞内取り込みあるいは細胞外への排出に関与することが明らかとなった。

マウスにはヒトにはないOCTN3の存在が示され、生理機能に種差のあることが示されたことや、構造的にも類似しながら、相互に顕著に異なる機能を有するOCTNアイソフォームの発見は、ゲノム解析等によって得られる構造的情報のみからでは、その機能の推測が困難であり、今後、構造-機能相関に関する検討により、トランスポーターの活性予測が可能になるような研究が必要であることを示すものである。

このような薬物動態に関与するトランスポーターの存在の実証研究は、今後の医薬品開発戦略に新しい考え方を付与すると同時に、臨床的な薬物間相互作用などによる体内動態変動要因の特定に結びつくものであり、さらなるトランスポーターの実態解明とその定量的意味付けの解析が必要とされる。

6. 研究発表

1. Uchino, H., Tamai, I., Yamashita, K., Minemoto, Y., Sai, Y., Yabuuchi, H., Miyamoto, K., Takeda, E. and Tsuji, A. *p*-Aminohippuric acid transport at renal apical membrane mediated by human inorganic phosphate transporter NPT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**, 254-9 (2000).
2. Ogihara, T., Tamai, I. and Tsuji, A. Structural requirements of substrates for stereoselective monocarboxylate transport in Caco-2 cells. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **6**, 161-165 (2000).
3. Ogihara, T., Tamai, I. and Tsuji, A. In situ and in vitro evidence for stereoselective and carrier-mediated transport of monocarboxylic acids across intestinal epithelial tissue. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 855-859 (2000).
4. Tamai, I., Ogihara, T., Takanaga, H., Yabuuchi, H., Tsuji, A., Anion antiport is involved in transport of lactic acid across intestinal epithelial brush-border membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, (2000) **1468**, 285-292.
5. Tamai, I., Yamashita, J., Kido, Y., Ohnari, A., Sai, Y., Shima, Y., Naruhashi, K., Koizumi, S., Tsuji, A., Limited distribution of new quinolone antibacterial agents into brain owing to multiple efflux transporters at the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2000) **295**, 146-152.
6. Nakaniishi, T., Tamai, I., Takaki, A., Tsuji, A., Cancer cell targeted drug delivery utilizing oligopeptide transport activity. *Int. J. Cancer.* (2000) **88**, 274-280.
7. Mayatepek E., Nezu J., Tamai I., Oku A., Katsura M., Shimane M and Tsuji A.: Two novel missense mutations of the OCTN2 gene (W283R and V446F) in a patient with primary systemic carnitine deficiency. *Hum. Mutat.* (Online), **15**:118 (2000).
8. Tamai I., Ohashi R., Nezu J., Sai Y., Kobayashi D., Oku A., Shimane M., Tsuji A.: Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *J. Biol. Chem.*, **275**: 40064-40072 (2000).
9. 崔 吉道、玉井郁巳、辻 彰：有機カチオン/カルニチントランスポーターと疾患。化学と生物、38巻、432-438 (2000)。
10. 木村圭一、遠藤良夫、太田安彦、渡辺洋宇、佐々木琢磨：Angiogenesis と肺がん。THE LUNG perspectives、**8**：89-93 (2000)
11. Ninomiya, I., Endo, Y., Fushida, S., Sasagawa, T., Miyashita, T., Fujimura, T., Nishimura, G., Tani, T., Hashimoto, Y., Yagi, M., Shimizu, K., Ohta, T., Yonemura, Y., Inoue, M., Sasaki, T. and Miwa, K. : Alternation of beta-catenin expression in esophageal squamous-cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, **85**: 757-761 (2000)
12. Kimura, K., Endo, Y., Yonemura, Y., Heinzmann, C. W., Schafer, B. W., Watanabe, Y. and Sasaki, T. : Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.*, **16**: 1125-1131 (2000)
13. 米村豊、二宮致、伏田幸夫、木下一夫、鯨坂秀之、藤村隆、三輪晃一、遠藤良夫、佐々木琢磨、杉山

- 和夫、沢敏治：胃癌のマイクロメタスタシス。消化器科、30：23-30 (2000)
14. 田中基裕、遠藤良夫、佐々木琢磨：非フッ化ピリミジン療法の新たな展開、In：癌治療の新たな試み新編II (西條長宏編)。医薬ジャーナル、大阪、77-85頁 (2000)
 15. Maeda, M., Iigo, M., Tsuda, H., Fujita, H., Yonemura, Y., Nakagawa, K., Endo, Y. and Sasaki, T. : Antimetastatic and antitumor effects of 2,4-diamino-6-(pyridine-4-yl)-1,3,5-triazine (4PyDAT) on the high lung metastatic colon 26 tumor in mice. *Anti-Cancer Drug Design*, 15: 217-223 (2000)
 16. Moriguchi, T., Asai, N., Wada, T., Seio, K., Sasaki, T. and Sekine, M. : Synthesis and antitumor activities of Phosmidosine A and its N-acylated derivative. *Tetrahedron Lett.*, 5881-5885 (2000)
 17. Yonemura, Y., Endo, Y., Fujita, H., Fushida, S., Bandou, E., Taniguchi, K., Miwa, K., Sugiyama, K. and Sasaki, T. : Role of MMP-7 in the formation of peritoneal dissemination in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 3: 63-70 (2000)
 18. Ikeuchi, Y., Sumiya, M., Kawamoto, T., Akimoto, N., Mikata, Y., Kishigami, M., Yano, S., Sasaki, T. and Yoneda, F. : Synthesis and antitumor activities of novel 5-deazaflavin-sialic acid conjugate molecules. *Bioorg. Med. Chem.*, 8: 2027-2035 (2000)
 19. Yonemura, Y., Endo, Y., Kimura, K., Fushida, S., Bandou, E., Taniguchi, K., Kinoshita, K., Ninomiya, I., Sugiyama, K., Heinzmann, C. W., Schafer, B. W. and Sasaki, T. : Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Clin. Cancer Res.*, 6: 4234-4242 (2000)
 20. 小幡 徹、佐々木琢磨：薬剤耐性機構。総合臨床、50：197-203 (2001)
 21. Ohta, Y., Kimura, K., Tamura, M., Oda, M., Tanaka, M., Sasaki, T. and Watanabe, G. : Biological characteristics of carcinomatosa pleuritis in orthotopic model systems using immune-deficient rats. *Int. J. Oncol.*, 18: 499-505 (2001)
 22. Kawamura, T., Endo, Y., Yonemura, Y., Nojima, N., Fujita, H., Fujimura, T., Obata, T., Yamaguchi, T. and Sasaki, T. : Significance of integrin $\alpha 2/\beta 1$ in peritoneal dissemination of a human gastric cancer xenograft model. *Int. J. Oncol.*, in press.
 23. Shimamoto, Y., Fujioka, A., Kazuno, H., Murakami, Y., Ohshimo, H., Kato, T., Matsuda, A., Sasaki, T. and Fukushima, M. : Antitumor activity and pharmacokinetics of TAS-106, 1-(3-C-ethynyl-b-D-ribo-pentofuranosyl)-cytosine. *Jpn. J. Cancer Res.*, in press.
 24. Uchida, H., Morinaga, H., Misaki, T., Miyazaki, T., Uwajima, T., Obata, T., Endo, Y., Matsuda, A. and Sasaki, T. : A novel Affinity chromatography method for the copurification of deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Nucleosides & Nucleotides*, in press.
 25. Uemura, H., Irahara, M., Yoneda, N., Yasui, T., Genjida, K., Miyamoto, K., Aono, T., Takeda, E. : Close correlation between estrogen treatment and renal phosphate reabsorption capacity. *J. Clin. Endoc. Metab.*, 85: 1215-1219 (2000).
 26. Kanai, Y., Fukasawa, Y., Cha, S.H., Segawa, H., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Matsuo, H., Kim, J.Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H. : Transport properties of a system y⁺L neutral and basic amino acid transporter: Insights into the mechanisms of substrate recognition. *J. Biol. Chem.*, 275: 20787-20793 (2000).
 27. Miyamoto, K., Tatsumi, S., Segawa, H., Ohkido, I., Takeda, E. : Identification and functional analysis of three isoforms for the Na⁺-dependent co-transporter (NaPi-2) in rat kidney. *Nephrol Dial Transplant*, 15(6) : 31-33 (2000).
 28. Miyamoto, K., Ito, M., Segawa, H., Kuwahata, M. : Secondary hyperparathyroidism and phosphate sensing in parathyroid glands. *J. Med. Invest.* 47(3,4): 118-122 (2000).
 29. Takeda, E., Taketani, Y., Morita, K., Tatsumi, S., Katai, K., Nii, T., Yamamoto, H., Miyamoto, K. : Molecular mechanisms of mammalian inorganic phosphate homeostasis. *Adv. Enzyme Regul.* 40: 285-302 (2000).

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社