

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7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

課題番号				
<del>71253</del> 20000997A	71253	臨床試験の予見性を高めるための、ヒト組織を用いた医薬品の安全性・有効性評価手法の確立に関する研究	大野 泰雄	…… 1
20001001A	72001	日本におけるヒト肝細胞の保存・管理に関する基準の検討	小林 英司	…… 10
20001002A	72002	日本人の肝及び腎の薬物排泄能の個人差と遺伝子多型	遠藤 仁	…… 14
20001004A	72003	ヒト組織新鮮材料を用いた薬物の作用評価の研究 －産学共同のネットワーク作りをめざして－	松浦 成昭	…… 21
20000998A	72004	高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物の有効性、安全性評価法の確立	永森 静志	…… 25
20001003A	72005	ヒト薬物代謝酵素遺伝子多型簡易迅速定量法の臨床応用の新展開 －医薬品の適性使用と医療経済の効率化を目的として－	水柿 道直	…… 29
20001005A	72006	臓器移植患者におけるP-糖蛋白質及びCYP3A4の定量的解析を基盤とした免疫抑制剤の適正使用法確立に関する研究	乾 賢一	…… 39
20001000A	72007	エンドトキシン作用の種特異性の機構解明と、医薬品の有効性・安全性評価への応用に関する研究	棚元 憲一	…… 45
20000999A	72008	肝移植により摘出された患者肝細胞の保存方法の確立と病的細胞の分子生物学的解析	香坂 隆夫	…… 55

## 日本人の肝及び腎の薬物排泄能の個人差と遺伝子多型

所属 杏林大学医学部薬理学教室  
研究者 遠藤 仁

### 分担研究者

杏林大学医学部 金井 好克  
杏林大学医学部 武田 理夫  
杏林大学医学部 細山田 真  
杏林大学医学部 車 碩鎬  
杏林大学医学部 稲富 淳  
杏林大学医学部 金 徒慶  
手稲溪仁会病院 宮ノ下 昭彦

### 要 旨

多色蛍光 PCR-SSCP により薬物の腎排泄に関与する hOAT1 遺伝子について SNPs の検出を行い、72 名の日本人のゲノム DNA サンプルより 5'非翻訳領域に 3ヶ所、イントロン 5 および 8、およびエクソン 6 に SNPs を認めた。

### 1. 研究目的

薬物トランスポーター分子の発現量と相関すると考えられる表現型（薬物排泄能）の個人差と、薬物トランスポーター遺伝子の遺伝子型の個人差（遺伝子多型）との関連を検討することにより、肝および腎における薬物排泄の個人差に起因する薬物治療時の副作用の発生を予測し回避するシステムの確立がこの研究の最終目標である。我々が cDNA クローニングした hOAT1 は抗生物質や非ステロイド性抗炎症剤などの腎臓からの排泄に主要な役割を演じていると考えられている薬物トランスポーターであり、まずこの hOAT1 について遺伝子型の個人差と表現型の個人差について検討し、関連を検討することを本研究の目的とした。

### 2. 研究方法

#### ①hOAT1 遺伝子における遺伝子型の個人差の解析

72 名の日本人から本研究に使用することを同意のもとに末梢血からゲノム DNA サンプルを調整した。0.1  $\mu$ g のゲノムサンプルをテンプレートとして多色蛍光 PCR-single-strand conformation polymorphism (SSCP) 法で一次スクリーニングを行った。具体的には各エクソンが 200bp~300bp の PCR 産物として増幅できるように 24base プライマーを設計し、センスプライマーとアンチセンスプライマーの 5'端に異なる蛍光色素 (6-FAM および HEX) を結合させた。ただし hOAT1 遺伝子の第 1 エクソンは 600bp 以上あるために複数の PCR 産物で検討した。PCR 産物をマルチスクリーン PCR (ミリポア) によって精製し、ABI 310 Genetic Analyzer を用いてキャピラリー電気泳動を未変性条件、30℃で行ない、溶出パターンを GeneScan ソフトウェアで解析した。サイズマーカーとして ROX 結合 GS500 (ABI)を同時に泳動した。

ダイレクトシーケンスは蛍光を結合していないプライマーを用いて PCR 増幅した後に、BigDye terminator sequence kit (ABI)でシーケンス反応を行い、反応後 DyeEx キット (QIAGEN)により精製後、ABI 310 Genetic Analyzer でシーケンス解析を行った。テンプレートとしては上記 SSCP 産物あるいはゲノムサンプル 0.5  $\mu$ g を用いた。

#### ②hOAT1 遺伝子における表現型の個人差の解析

hOAT1 の表現型は不明であるので、ヒト腎臓における hOAT1 タンパクの発現量を表現型の指標として検討するために、手術により摘出した日本人の腎臓サンプル 4 件を入手した。

### 3. 研究成果

転写開始点上流約 100bp を含むエクソン領域 3938bp について 72 名のゲノム DNA サンプルから

SSCP による変異の検索を行った結果、図に示したように 6 ケ所の SNPs を同定することが出来た。その内訳は 5'非翻訳領域に 2 ケ所の SNPs と 1 ケ所の variant、イントロン 5 および 8 に SNPs (intron SNPs)、およびエクソン 6 にアミノ酸変異を伴う coding SNP (cSNPs) である。さらに 3 ケ所について SNPs の存在が予想された。アレル頻度が SSCP によって判明しているものについては図に示したとおりである。

#### 4. 考察

例えば毛細胆管上の薬物トランスポーターである MRP2 の変異が、体質性黄疸である Dubin-Johnson 症候群と関連するといったような遺伝子の変異に伴う表現型の変化についての知見が、hOAT1 ではまだ不明である。したがって表現型を指標に遺伝子型の変異体を選別してこないことが出来ない。遺伝子変異体の発見には大量のサンプルを検討する必要がある、スクリーニングの効率化が要求される。本研究については一次スクリーニングとして多色蛍光 PCR-single-strand conformation polymorphism (SSCP) 法を行うことによりスクリーニングの効率化を計ったが、false-negative が問題となり、実際本研究においても、エクソン 6 における cSNPs は SSCP で検出することができなかった。false-negative の少ない遺伝子変異の検出法の検討が要求されるほかに、hOAT1 の表現型の情報が活用できるようになった場合にはダイレクトシーケンスによる変異検索が必要になると考えられる。

表現型の変異については 1. 親和性の変化など輸送活性の変化 (質の変化)、2. 発現量の変化、の 2 種類があるが、1. については cSNPs による hOAT1 タンパクのアミノ酸変異や、共役タンパクの変化が関与する場合があげられる。hOAT1 について共役タンパクの存在は想定されていないので、cSNPs による hOAT1 タンパクのアミノ酸変異について検討すれば良い。アミノ酸変異を導入した遺伝子機能をつメガエル卵母細胞発現系や乳動物細胞発現系で検討することにより、生体での機能変化を類推することが可能であり、エクソン 6 の cSNPs に伴うアミノ酸変異については今後変異体を作成し機能を検討する予定である。2. については摘出組織を用いて hOAT1 発現量の検討を予定している。発現量の変化はシス因子、すなわちプロモーター領域やエンハンサーあるいはサブレッサー領域の SNPs (すなわち regulatory SNPs) が関与するが、プロモーター領域やエンハンサー、サブレッサー領域の同定が先に必要であり、今後の検討課題である。またトランス因子の発現量の変化も関与するが、トランス因子の同定が必要である。

#### 5. 結論

腎臓において薬物の尿細管分泌に関与すると考えられる hOAT1 遺伝子について多色蛍光 PCR-SSCP により SNPs の検出を行った。72 名の日本人のゲノム DNA サンプルより 5'非翻訳領域に 2 ケ所の SNPs と 1 ケ所の variant、イントロン 5 および 8 に intron SNPs、およびエクソン 6 にアミノ酸変異を伴う coding SNP を認めた。

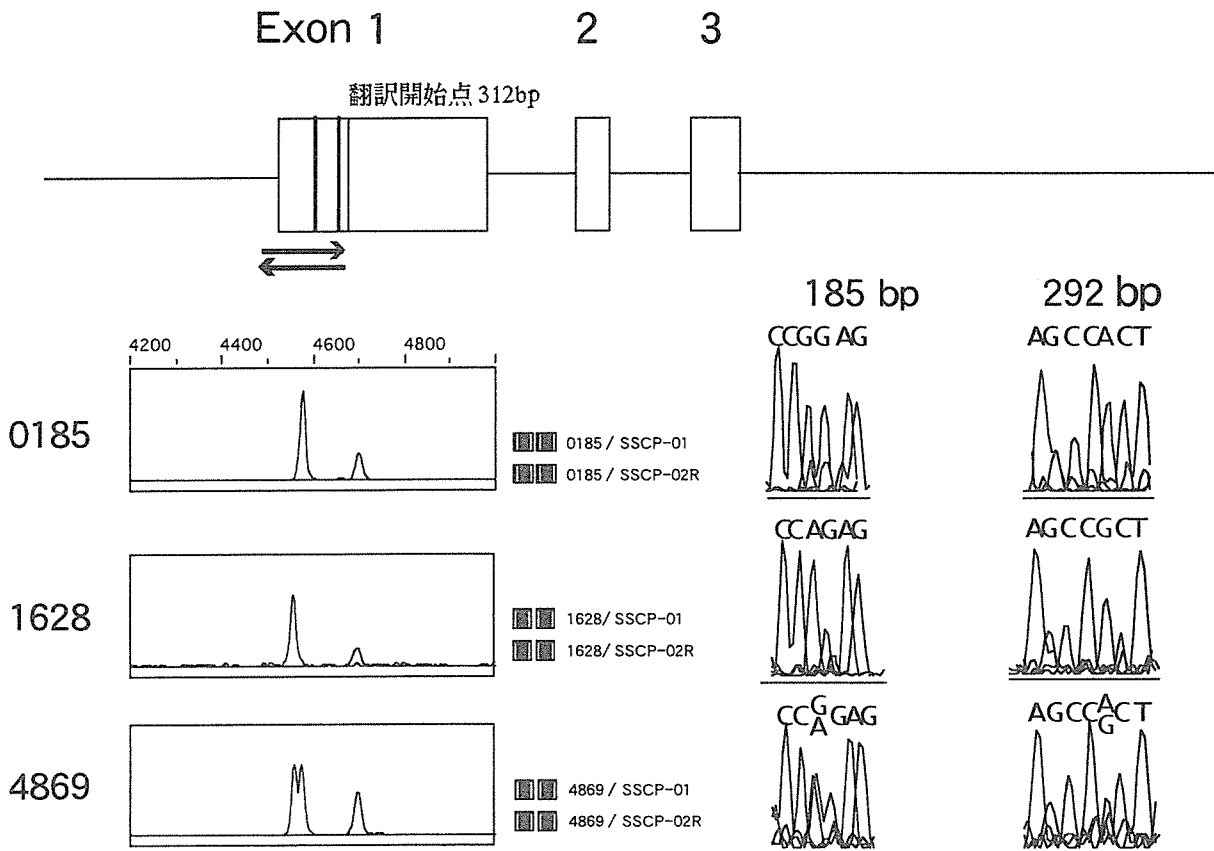
#### 6. 研究発表

- 1) Cha, S.H., Sekine, T., Kusuhara, H., Yu, E., Kim, J.Y., Kim, D.Y., Sugiyama, Y., Kanai, Y. and Endou, H.: Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. *J. Biol. Chem.* 275: 4507-4512, 2000
- 2) Okuda, T., Haga, T., Kanai, Y., Endou, H., Ishihara, T. and Katsura, I.: Identification and characterization of high-affinity choline transporter. *Nature Neuroscience* 3(2): 120-125, 2000
- 3) Fukasawa, Y., Segawa, H., Kim, J.Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Endou, H. and Kanai, Y.: Identification and characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter which associates with the 4F2 heavy chain and exhibits selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J. Biol. Chem.* 275(13): 9690-9698, 2000

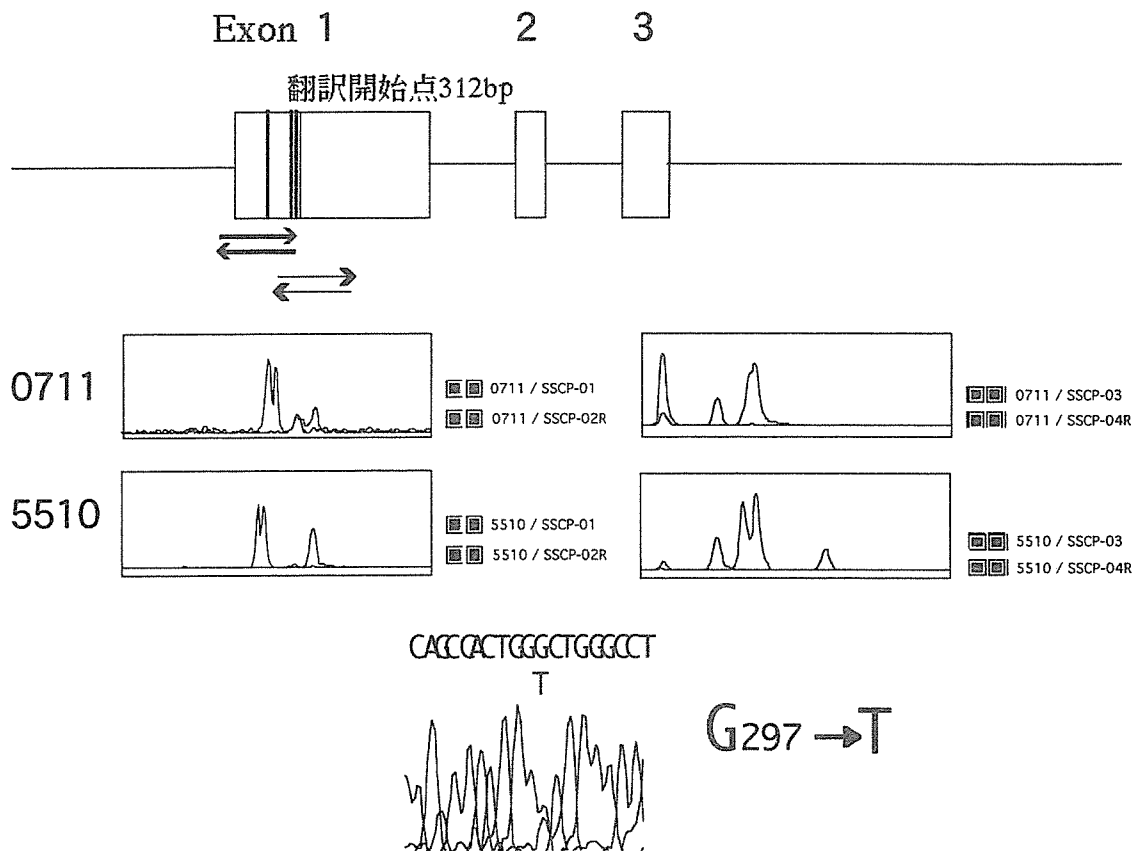
- 4) Nakajima, N., Sekine, T., Cha, S.H., Tojo, A., Hosoyamada, M., Kanai, Y., Yan, K., Awa, S. and Endou, H. : Developmental changes in multispecific organic anion transporter 1 (OAT1) expression in the rat kidney. *Kidney Int.* 57: 1608-1616, 2000
- 5) Kanai, Y., Fukasawa, Y., Cha, S.H., Segawa, H., Chairoungdua, A., Kim, D.Y., Matsuo, H., Kim, JY, Miyamoto, K., Takeda, E. and Endou, H.: Transport properties of a system y+L neutral and basic amino acid transporter. *J. Biol. Chem.* 275(27): 20787-20793, 2000
- 6) Takeda, M., Sekine, T. and Endou, H.: Regulation by protein kinase C of organic anion transport driven by rat organic anion transporter 3 (rOAT3). *Life Sci.* 67: 1087-1093, 2000
- 7) Sekine, T., Cha, S.H., Endou, H: The multispecific organic anion transporter (OAT) family. *Pflügers Arch- Eur. J. Physiol.* 440: 337-350, 2000
- 8) Nakauchi, J., Matsuo, H., Kim, D.K., Goto, A., Chairoungdua, A., Cha, S.H., Shiokawa, Y., Yamaguchi, K., Saito, I., Endou, H. and Kanai, Y.: Cloning and characterization of a human brain Na<sup>+</sup>-independent transport for small neutral amino acids that transports D-serine with high affinity. *Neurosci. Lett.* 287: 231-235, 2000
- 9) Wada, W., Tsuda, M., Sekine, T., Cha, S.H., Kimura, M., Kanai, Y. and Endou, H.: Rat multispecific organic anion transporter 1 (rOAT1) transports zidovudine, acyclovir, and other antiviral nucleoside analogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294(3): 844-849, 2000
- 10) Matsuo, H., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Cha, S.H., Fukuda, J., Endou, H. and Kanai, Y: Mouse Asc-1 (asc-type amino acid transporter 1) maps to chromosome 7, region B1-B5. *Chromosome Res.* 8: 456, 2000
- 11) Hara, C., Satoh, H., Usui, T., Kunimi, M., Noiri, E., Tsukamoto, K., Taniguchi, S., Uwatoko, S., Goto, A., Racusen, L.C., Inatomi, J. Endou, H., Fujita, T. and Seki, G.: Intracellular pH regulatory mechanism in a human renal proximal cell line (HKC-8); evidence for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger and Na<sup>+</sup> -HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter. *Pflügers Arch-Eur. J. Physiol.* 440: 713-720, 2000
- 12) Matsuo, H., Tsukada, S, Nakata, T., Chairoungdua, A., Kim, D.K, Cha, S.H., Inatomi, J., Yorifuji, H., Fukuda, J, Endou, H. and Kanai, Y.: Expression of a system L neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Neuroreport.* 11(16): 3507-3511, 2000
- 13) Takeda, M., Hosoyamada, M., Cha, Seok Ho., Sekine, T. and Endou, H.: Hydrogen peroxide downregulates human organic anion transporters in the basolateral membrane of the proximal tubule. *Life Science* 68: 679-687, 2000
- 14) Tsuganezawa, H, Kobayashi, K, Iyori, M, Araki, T, Koizumi, A, Watanabe, S, Kaneko, A, Fukao, T, Monkawa, T, Yoshida, T, Kim, DK, Kanai, Y, Endou, H, Hayashi, M and Saruta, T: A new member of the HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter superfamily is an apical anion exchanger of b-Intercalated Cells in the kidney. *J Biol. Chem.* 276: 8180-8189, 2001
- 15) Cha, S. H., Sekine, T., Fukushima, J., Kanai, Y., Kobayashi, Y., Goya, T., Endou, H: Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol* 59(5), 528-537, 2001

16) Mizoguchi,K, Cha,SH, Chairoungdua,A, Kim,DK, Shigeta,Y, Matsuo,H, Fukushima, J,Awa,Y, Akakura,K, Goya,T, Ito,H, Endou,H and Kanai,Y: Human cystinuria-related transporter: localization and functional characterization. *Kidney Int.* in press.

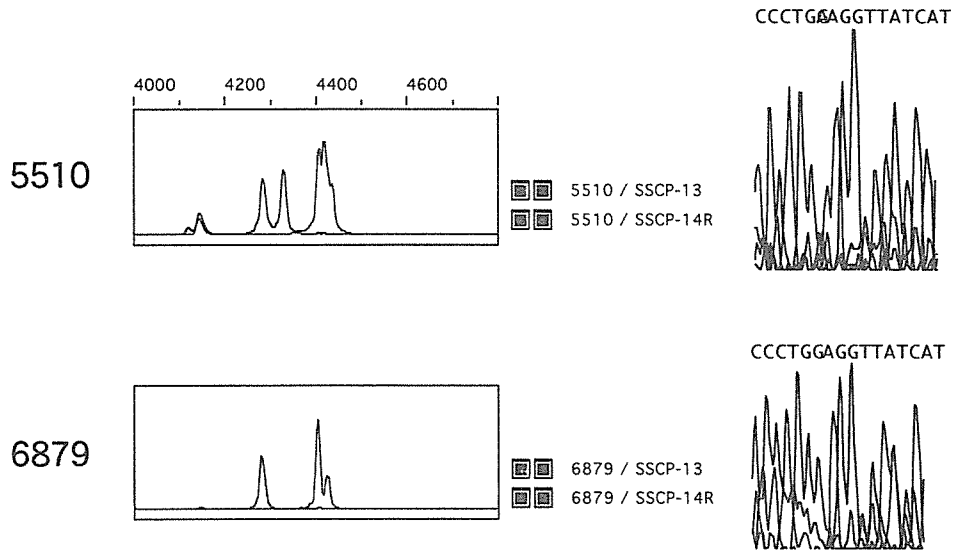
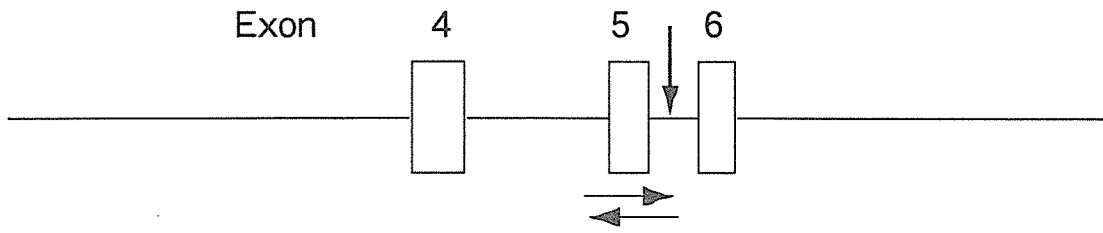
17) Kim,DK, Kanai,Y, Chairoungdua,A, Matsuo,H, Cha, SH and Endou,H: Expression cloning of a Na<sup>+</sup>-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H<sup>+</sup>/monocarboxylate transporters. *J Biol. Chem.* in press.



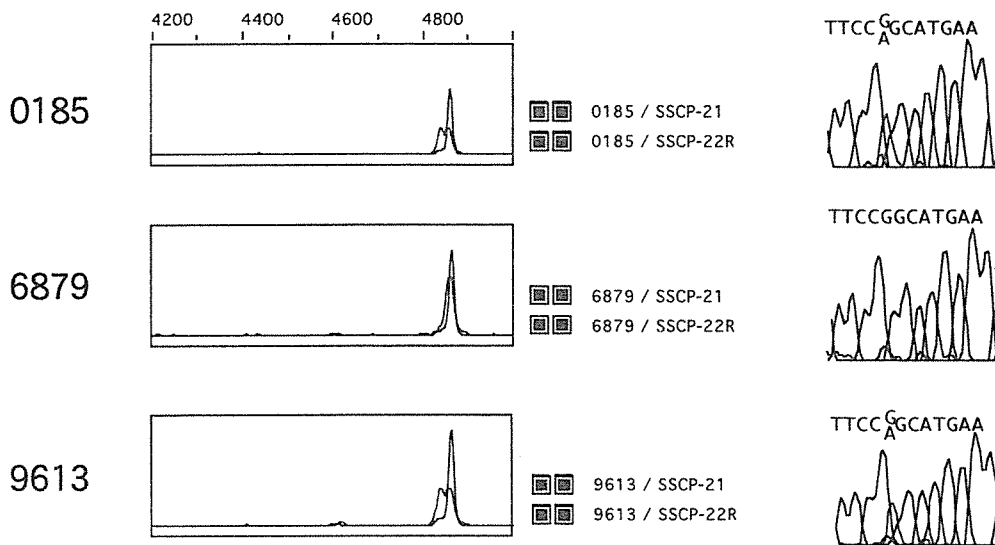
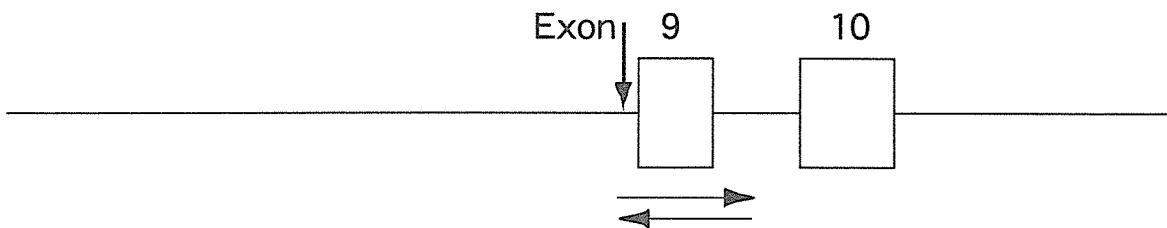
Two SNPs in 5' untranslated region of hOAT1 gene



A single nucleotide variant in 5' untranslated region of hOAT1 gene

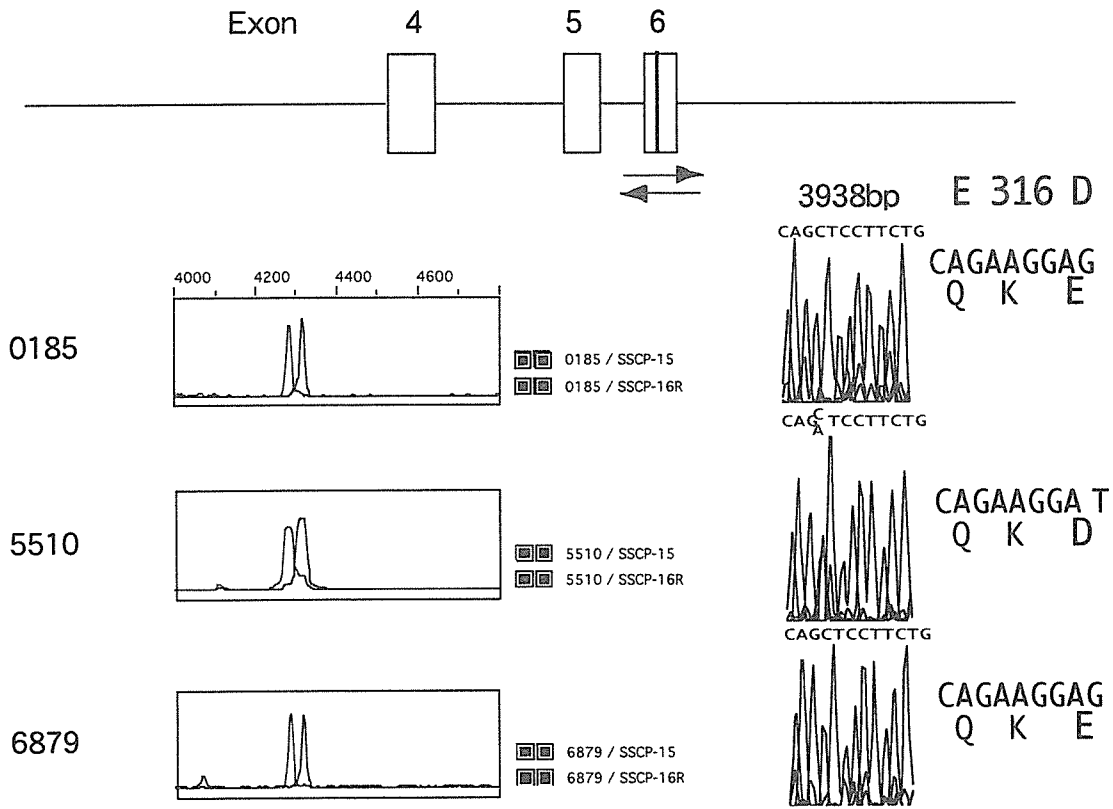


An iSNPs in the 5th intron of hOAT1 gene

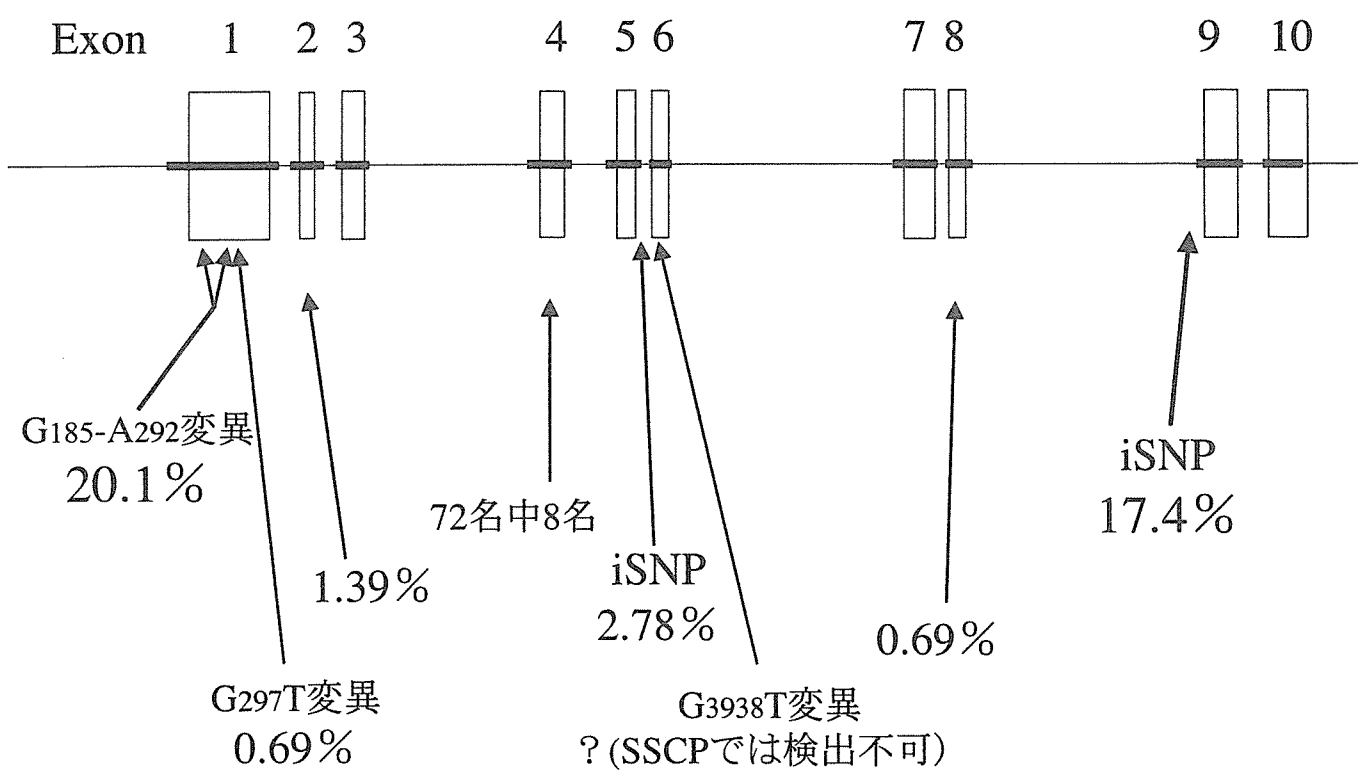


An iSNPs in the 8th intron of hOAT1 gene





A cSNPs in the 6th exon of hOAT1 gene



Allele frequency of SNPs in the 3398bp of hOAT1 gene identified from 72 Japanese genomes

---

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7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

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