

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

高齢者における薬物トランスポータ群の遺伝子機能解析  
～薬剤性腎障害の発症・増悪因子としての役割解明と至適投与設計法の基盤確立に関する研究  
(課題番号 H 1 2-ゲノム-0 1 9)

平成 1 3 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 乾 賢一  
分担研究者 土井 俊夫  
分担研究者 深津 敦司  
分担研究者 小川 修

平成 1 4 ( 2002 ) 年 3 月

# 目 次

I. 総括研究報告		
薬剤性腎障害の発症・増悪に関わる薬剤排泄タンパク質の分子同定と至適投与設計に関する研究 乾 賢一	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 薬剤排泄タンパク質群の発現変動と遺伝子多型・変異解析に関する研究 土井 俊夫	-----	12
2. 加齢・薬剤性腎障害に伴う薬剤排泄タンパク質の免疫組織学的解析に関する研究 深津 敦司	-----	15
3. 腎不全・腎腫瘍における薬剤排泄タンパク質群の遺伝子発現解析 ク質の免疫組織学的解析に関する研究 小川 修	-----	17
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	20
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	21

# 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

## 総括研究報告書

### 高齢者における薬物トランスポータ群の遺伝子機能解析

～薬剤性腎障害の発症・増悪因子としての役割解明と至適投与設計法の基盤確立に関する研究

主任研究者	乾 賢一	京都大学医学部附属病院教授・薬剤部長
研究協力者	齋藤 秀之	京都大学医学部附属病院薬剤部助教授・副薬剤部長
	増田 智先	京都大学医学部附属病院薬剤部・助手
	本橋 秀之	ヒューマンサイエンス振興財団・リサーチレジデント
	浦上 裕美子	日本学術振興会特別研究員

#### 【研究要旨】

ヒト腎に発現する薬物排泄タンパク質群（薬物トランスポータ）の薬物輸送特性並びに腎内発現分布・膜局在について比較精査するとともに、腎疾患、腎腫瘍等を発症した高齢患者腎における薬物トランスポータ遺伝子の発現変動と薬剤排泄能力との相関について解析を実施した。ヒト有機アニオントランスポータ hOAT1 の遺伝子を腎 cDNA ライブラリーより単離し、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて薬物輸送機能を解析した。hOAT1 は p-アミノ馬尿酸（PAH）、メトトレキサート（葉酸代謝拮抗薬）、プロスタグランジン E2、ジドブジン（抗ウイルス薬）、フロセミド（利尿薬）等、構造的に多様なアニオン性薬物の腎移行を仲介するトランスポータであることを実証した。ヒト有機カチオントランスポータ hOCT2 及びそのスプライシングバリエントである hOCT2-A の遺伝子単離に成功した。いずれのトランスポータも主として腎に発現し、種々のカチオン性薬物を認識することが判明した。

ヒト腎に発現する薬物トランスポータ遺伝子の発現量についてリアルタイム PCR 法による定量数値化を試みた。その結果、同時定量した常在遺伝子グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）の mRNA 発現量により RNA 精製効率や分解を補正することで、患者個人毎の腎組織に発現するトランスポータ遺伝子の発現量を定量数値化することに成功した。薬物トランスポータ群の中で有機アニオントランスポータ hOAT3 mRNA の発現量が最も高く、GAPDH mRNA の発現量の約 1/20 程度であった。また、アニオン性薬物の腎移行に関わる主要なトランスポータとして位置づけられている hOAT1 は hOAT3 に次いで 2 番目の発現量であった。有機カチオントランスポータ群では、hOCT2 mRNA の発現量が最も高く、ウエスタンブロットによりタンパクレベルでも hOCT2 の高い発現が確認された。新規遺伝子として単離した hOCT2-A は、hOCT2 の約 1/10 の発現量であった。hOAT1、hOAT3 及び hOCT2 について免疫組織染色を行った結果、いずれも近位尿細管側底膜に局在することが判明した。有機イオントランスポータファミリーである hOCTN1 及び hOCTN2 の発現も認められたが、hOCTN2 の発現量は hOCT2 の約 1/3 程度であり、hOCTN1 は 1/10 以下であった。β-ラクタム抗生物質や ACE 阻害剤などを輸送するペプチドトランスポータ群では、hPEPT1 が hPEPT2 と比較してより高い発現量を示した。ウエスタンブロット解析において hPEPT1 及び hPEPT2 タンパクはともに腎皮質における発現が認められ、また免疫組織染色の結果から近位尿細管刷子縁膜に発現することが明らかとなった。ATP 駆動型有機イオントランスポータ群では、抗癌剤やジゴキシンの排泄に関わる MDR1 の発現量が最も高く、次いでアニオン性薬物やグルクロン酸抱合体を輸送する MRP1 が高い遺伝子発現量を示した。腎機能低下患者から採取された腎生検試料の一部を用い、薬物トランスポータ群の遺伝子発現量を調べた結果、薬物トランスポータ群の中で hOAT1 mRNA の発現量が正常腎組織中と比較し約 1/10 程度まで低下していた。一方、hOAT3 や hOCT2 など他の薬物トランスポータ mRNA の発現量は正常腎組織と同程度であった。

腎生検を施行された腎疾患患者に対し感染症予防を目的として投与される抗生剤セファゾリンの血中濃度測定を実施し、体内動態パラメーターを算出した。腎疾患患者におけるセファゾリンの消失クリアランスは、既に報告されている健康人でのクリアランスと比較して有意な差は認められなかった。またセファゾリンの消失速度と相関する臨床検査値も認められなかった。一方、薬物トランスポータ発現量との相関について検討したところ、hOAT3 mRNA の発現量とセファゾリンの消失クリアランスとが正の相関を示すことが示唆された。従って、腎疾患患者ではセファゾリンの腎排泄に hOAT3 が深く関与することが示された。

以上の結果、尿細管トランスポータ群の薬物輸送特性並びに腎疾患時におけるトランスポータ遺伝子の発現変動解析は、薬剤性腎障害における個々トランスポータの機能的役割の解明、並びにそれに基づく至適薬剤投与設計法の基盤確立に有用な情報を提供するものと考えられる。

#### 【分担研究者】

1. 土井 俊夫・徳島大学医学部・教授
2. 深津 敦司・京都大学医学部附属病院・講師
3. 小川 修・京都大学大学院医学研究科・教授

#### A. 研究目的

加齢に伴う腎機能の低下によって薬剤性腎障害の発症頻度が著しく高くなり、また予後不良であることが高齢者に対する薬物療法上の深刻な問題点として提起されている。薬剤性腎障害は、薬剤の予期せぬ反応性・副作用として認識される。特に、血圧降下剤・血糖降下剤・非ステロイド性抗炎症剤・抗腫瘍剤等を服用している高齢患者では、腎機能低下とともに薬剤排泄障害による副作用発現や薬剤蓄積による腎毒性がしばしば発現し、重篤な腎不全に進展する例も少なくない。腎障害を引き起こす原因薬剤や発症機序が複雑・多様であるため、腎障害の回避・対策として腎機能の把握に基づいた至適投与計画と早期の発見が必須とされている。従って、各種疾患に付随する腎機能低下と薬剤排泄能力との関連、並びに薬剤性腎障害発現に関わる成囚・増悪因子が解明され予測・評価システムが確立されることにより、高齢者の薬剤に起因する腎障害の発症は未然に回避し得ると期待できる。さらに、薬剤性腎障害の発症（感受性）に個人差がみられることから、発症を左右する遺伝的素囚に基づいた患者個々の腎機能特性（薬剤排泄プロファイル）を掌握することにより、個々の患者に最適な薬剤選択や投与法等オーダーメイド治療を支援する処方設計が可能になると期待される。本研究では、腎機能低下高齢者、並びに薬剤性腎障害を発症した高齢患者を対象とし、増悪因子として関与が想定されている薬剤排泄タンパク質群（薬物トランスポータ）の発現変動及び遺伝子多型・変異について究明する。さらに加齢並びに腎機能低下・薬剤性腎障害における薬物トランスポータ群の発現プロファイルと遺伝子異常に関するゲノム情報を基盤として、薬剤排泄能力の評価系や腎障害惹起薬剤の予測系を構築することにより、患者の排泄能力を加味した適正な薬剤選択並びに至適投与設計法の基盤確立を本プロジェクトの最終的な到達目標として位置づける。

#### B. 研究方法

本研究では、腎機能低下が認められる高齢者並びに薬剤性腎障害を発症した高齢患者を対象とし、薬剤排泄タンパク質（薬物トランスポータ）を中心として、腎障害発症・増悪に関与する遺伝子探索と、それらの発現変動及び多型・変異について究明する。加齢並びに薬剤性腎障害における薬物トランスポータ群の発現プロファイルに関する情報を収集・整備し、薬剤排泄機能との相関解析を実施し、個々トランスポータの機能的役割について解明することを目的とした。これら薬物トランスポータ解析情報を基盤として、薬剤性腎障害の未然防止を含めた高齢患者個人に至適な薬剤選択並びに投与設計法の確立をめざす。

本研究計画は3年間（平成12～14年度）を予定しており、平成13年度は、（1）ヒト型薬物トランスポータの遺伝子同定とそれに基づく組織発現分布、薬物輸送特性について解析した。並行して、（2）腎機能低下を伴う疾患（腎不全、糸球体腎炎、腎腫瘍など）並びに薬剤性腎障害を発症している高齢患者群を対象として、薬物トランスポータ群の遺伝子発現変動・患者毎の発現タイプングに関する比較精査、並びに薬剤排泄能との相関解析を実施した。

#### 1. ヒト型薬物トランスポータの遺伝子同定と機能・組織学的解析

現在までに、薬剤腎排泄を担う主要薬物トランスポータとして以下に示す遺伝子ファミリーが同定され、各々について複数の構成メンバーが単離・機能解析が進められている。

- 1) 有機アニオントランスポータ（OAT 遺伝子ファミリー）
- 2) 有機アニオントランスポータ（oatp(OAT-K) 遺伝子ファミリー）
- 3) 有機カチオントランスポータ（OCT(N) 遺伝子ファミリー）
- 4) ペプチドトランスポータ（PEPT 遺伝子ファミリー）
- 5) ATP駆動型有機イオントランスポータ（ABC 遺伝子スーパーファミリー）

これらの薬物トランスポータ遺伝子ファミリーの約80%については既にヒト型ホモログが分子同定されているが、OATやOCTファミリーには未

同定のメンバーが存在するため、ヒト腎遺伝子ライブラリのスクリーニングやPCR法を駆使して主要薬物トランスポータのヒトホモログのcDNAを単離する。単離した薬物トランスポータcDNAの薬物輸送機能は、アフリカツメガエル卵母細胞発現系及び遺伝子導入発現細胞系を用いて精査した。また特異抗体を用いた薬物トランスポータの免疫組織学的解析を実施し、薬剤輸送特性と細胞膜局在性から、薬剤腎排泄における機能的役割を推定した。本計画は、研究代表者と同施設（京都大学医学部附属病院薬剤部）所属の研究協力者が中心となって実施した。

## 2. 腎疾患患者における薬物トランスポータ群・関連遺伝子の発現変動並びに遺伝多型・変異に関する解析

腎疾患及び腎腫瘍等の疾患を有する患者を対象とし、病理診断用の腎生検標本の一部、または腎腫瘍治療目的により摘出された腎組織の一部を用いて遺伝子を分離調製し、リアルタイムPCR法、ノザンプロット解析により薬物トランスポータ群の遺伝子発現レベルに関する情報を収集した。さらに、腎生検施行時に投与される抗生物質（腎排泄型薬剤）の血中濃度を測定し、体内動態パラメーターを算出した。また免疫組織学的解析により、トランスポータタンパク質の発現変動についてデータを収集し、遺伝子発現量とタンパク質発現量との定量的な相関性について検討を加えた。

### （倫理面への配慮）

本研究は、ヘルシンキ宣言（1975年、東京総会で修正）を尊重し計画されたものであり、対象患者個人のプライバシーをはじめとする人権擁護を優先する。すなわち、自由意思による同意が得られた場合にのみ実施対象とすること、同意した場合でも随時撤回でき、それによる不利益を受けることはないこと、血液や組織由来の核酸が他の目的に使用されないこと、実施対象者の個人識別情報は連結可能匿名化方式（本研究では、腎薬物トランスポータ遺伝子の解析結果と薬物動態・薬物毒性の解析結果との比較解析を中心的な検討項目としているため、本方式での管理・保護が必要と考えられる）で厳重に管理・保護されること、遺伝子解析結果を含むすべての検査結果については守秘義務を守ること、研究成果の発表に際しては、個人が特定できない方法での

み行うこと、を遵守する。腎組織の採取については、従来の病理検査の一環として行われるため、本研究のために改めて、または過量の採取をするものではなく、患者の不利益及び危険性は伴わない。また摘出腎組織試料は、本研究のために採取するものではなく、腎腫瘍等の外科的治療により摘出した組織の一部を使用するものであり、実施対象並びに研究成果の発表等については、上記と同様に対象患者個人の人権擁護を優先する。遺伝カウンセリングは原則として行わないが、対象患者個人の「知る権利」及び「知らないでいる権利」を保護するため、患者自身の要望に応じ実施することとする。なお、本研究計画の実施（血液及び腎生検試料の一部を用いた薬物トランスポータ遺伝子の発現並びに遺伝多型・変異解析）にあたり、「腎に発現する薬物輸送体の発現量定量と遺伝子解析に関する臨床研究」という題目で京都大学医学研究科・医学部医の倫理委員会より平成12年8月23日に承認書が交付されている。摘出腎組織を用いた薬物トランスポータ遺伝子の発現並びに多型・変異解析については、「腎機能不全に関わる尿細管解毒システムの遺伝子解析に関する臨床研究」の題目で京都大学医学研究科・医の倫理委員会より平成13年3月28日に承認書が交付されている。

## C. 研究成果

### 1) ヒト型薬物トランスポータの遺伝子単離と機能解析

腎尿細管には複数種の薬物トランスポータ群が発現しており、効率的な異物・薬物の尿中排泄を媒介している。一般に、血液中の薬物は腎尿細管側底膜に局在する有機アニオンまたは有機カチオントランスポータの媒介により、上皮細胞内に取り込まれる。細胞内に取り込まれた薬物は、刷子縁膜に局在するトランスポータにより管腔中へ分泌される（Fig. 1.）。各々の薬物トランスポータは構造的、機能的に異なる膜タンパク質であり、血液中に存在する多様なイオン性異物や不要代謝産物を認識し能動的に尿中へ汲み出すことにより、体液バランスの維持に重要な役割を果たしている。分子生物学的手法の導入により、これら薬物トランスポータ群の実体解明が進展し、各々の尿細管分布や機能的役割について解析が進められている。

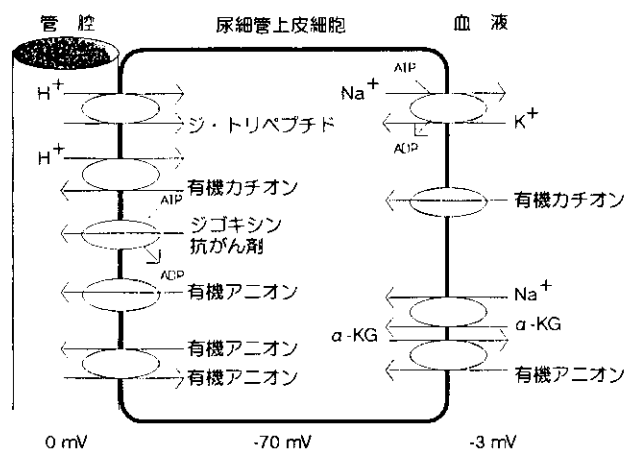


Fig. 1. 尿細管上皮細胞における有機アニオン、有機カチオンの分泌機構。

1997年に遺伝子同定されたOAT1は、p-アミノ馬尿酸（PAH）をはじめとする多様なアニオン性薬物の腎移行に関わる主要な有機アニオントランスポータとして位置づけられているが、ヒト型トランスポータの薬物認識特性については不明点が多い。そこで、hOAT1の遺伝子をヒト腎cDNAライブラリーより単離し、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて薬物輸送機能を解析した。hOAT1発現卵母細胞では、顕著なPAH取り込み活性の上昇がみられた。また、細胞内に予め負荷した $\alpha$ -ケトグルタル酸（ $\alpha$ -KG）によりPAH取り込みの促進効果が観察され、 $\alpha$ -KGを逆向きの駆動力とするトランスポータであることが確認された。hOAT1は、メトトレキサート（葉酸代謝拮抗薬）、プロスタグランジンE<sub>2</sub>、ジドブジン（抗ウイルス薬）、オクラトキシンA（カビ毒）等、構造的に多様なアニオン性薬物を輸送することが判明した（Fig. 2）。さらに、尿細管分泌を受けるフロセミドやアセタゾラミド等の利尿薬の輸送活性を有することが判明した。以上の結果から、hOAT1は尿細管側底膜に局在し、種々のアニオン性薬物や内因性有機アニオンの能動的な腎移行を仲介するトランスポータであることが示唆された。

単離膜小胞系や培養細胞系等を用いた研究により、カチオン性薬物の尿細管分泌は、有機カチオントランスポータにより媒介されていることが、機能面を中心に実証されてきた。すなわち、血液側側底膜に膜電位依存性のトランスポータ、管腔側刷子縁膜にH<sup>+</sup>勾配を駆動力とするアンチポータが局在し、血

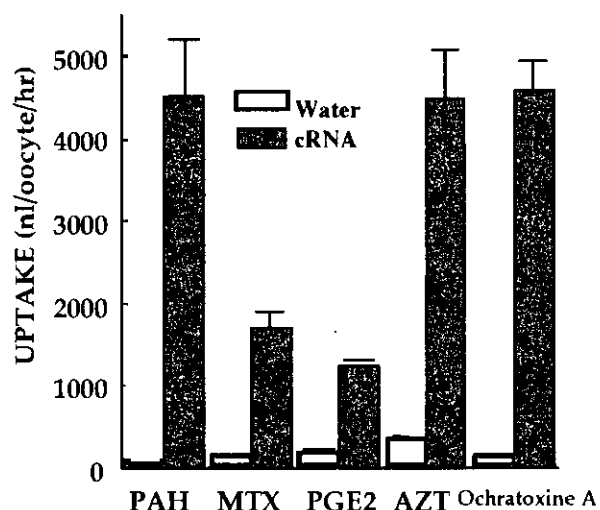


Fig. 2. hOAT1発現卵母細胞による薬物取り込み。PAH, p-アミノ馬尿酸; MTX, メトトレキサート; PGE<sub>2</sub>, プロスタグランジンE<sub>2</sub>; AZT, ジドブジン。

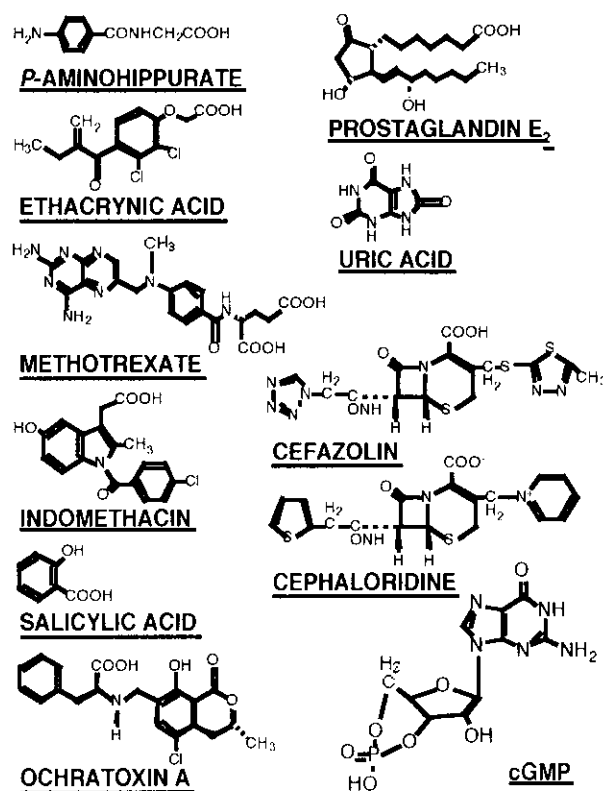


Fig. 3. hOAT1により認識される薬物及び内因性物質。

液中に存在するカチオン性異物や代謝産物の効率的な経細胞輸送を営んでいることが提唱されてきた。我々は、1996年にラット腎に発現する有機カチオントランスポータrOCT2の遺伝子をクローニングし、構造、組織分布、細胞膜局在、薬物輸送特性等について系統的な解析を進めてきた。その結果、rOCT2は近位尿細管側底膜に局在する推定12回膜

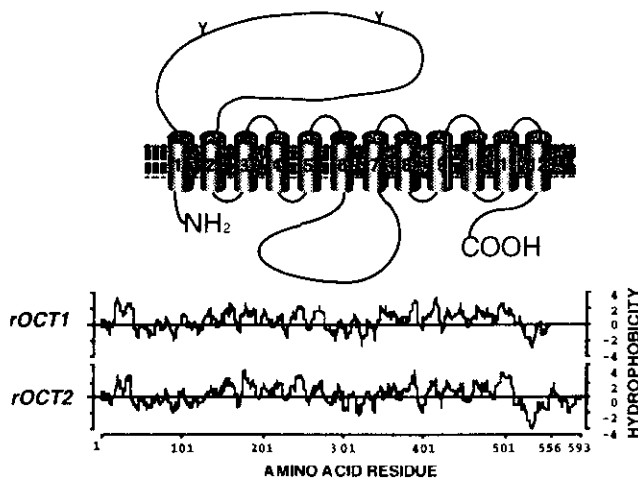


Fig. 4. rOCT2 の推定二次構造. 下図は rOCT1 及び rOCT2 の疎水性プロット.

貫通型糖タンパク質であること、テトラエチルアンモニウム (TEA)、シメチジンをはじめとする構造的に多様なカチオン性薬物を認識する多選択性のトランスポーターであることを実証した (Fig. 4)。1997年にヒト hOCT2 遺伝子が単離され、構造、臓器発現、薬物認識特性について報告されたが、その尿細管分布や局在については不明であり、薬物腎排泄における機能的役割については未解明である。また、尿細管には複数種の有機カチオントランスポーターの発現していることが、機能的な研究から示唆されているが、その実体については不明である。そこで本研究では、ヒト腎に発現する有機カチオントランスポーター hOCT2 並びにその類似遺伝子・アイソフォームの遺伝子単離を試みた。

hOCT2 の塩基配列を基に化学合成した degenerate primer を用いて、ヒト腎 cDNA ライブラリー (human kidney Rapid-Screen cDNA library panel) を PCR 法によってスクリーニングした。その結果、hOCT2 及び hOCT2-A cDNA を単離した。オープンリーディングフレームの塩基配列から、hOCT2-A は 483 個のアミノ酸から構成され、hOCT2 と 81% のアミノ酸相同性を示すことが明らかとなった。Hydropathy 解析並びに二次構造解析の結果、hOCT2 が 12 回膜貫通型であるのに対し、hOCT2-A は 9 回膜貫通型のタンパクであることが推定された。hOCT2-A は、第 1 細胞外ループに 3ヶ所、9 回目の膜貫通領域後に 1ヶ所の糖鎖結合部位が存在することが推測された。また、ゲノム検索を行ったところ、hOCT2-A と hOCT2 は同じ染色体上に位置し、hOCT2 のエキソン 7 及びエ

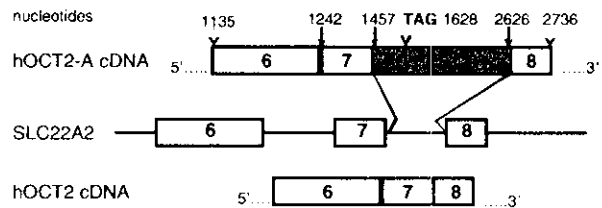


Fig. 5. hOCT2 遺伝子 (SLC22A) とオルタナティブスプライシングによる hOCT2-A の転写機構.

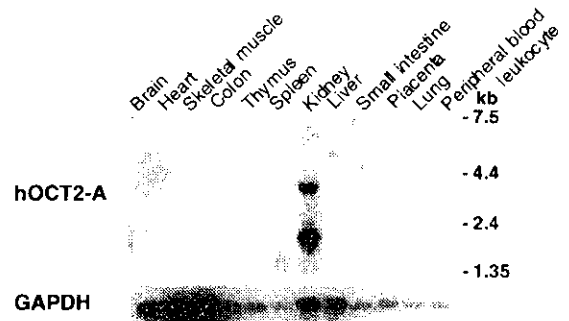


Fig. 6. ヒト組織における hOCT2-A mRNA の発現分布.

キソン 8 に挟まれたイントロンに相当する配列が、スプライシングを受けずに hOCT2 cDNA に挿入された、hOCT2 のスプライシングバリエーションであることが判明した (Fig. 5)。次に、hOCT2-A の臓器分布を明らかにするために、ハイストリンジェンシーの条件下、ノーザンブロットングを行った結果、hOCT2-A mRNA 由来の 4.2 kb と 2.7 kb のバンドが、腎臓のみに検出された (Fig. 6)。hOCT2-A 薬物輸送特性について hOCT2 と比較検討するために、各 cDNA を遺伝子導入した HEK293 細胞を用いて TEA の取り込み実験を行った。hOCT2-A 発現細胞による TEA 取り込みは、hOCT2 発現細胞と同様に、ベクターのみを導入したコントロールに比べて顕著に上昇した。さらに、hOCT2-A 発現細胞による TEA 取り込みは、基質濃度上昇に伴い飽和性を示し、みかけの  $K_m$  値は  $46 \mu\text{M}$  と算出された。hOCT2-A による有機カチオン輸送の駆動力について調べるため、TEA 取り込みに及ぼす膜電位の影響について hOCT2 と共に比較検討した。細胞は、生理的条件下において  $\text{K}^+$  勾配により細胞内負の膜電位を形成している。細胞外液中の  $\text{Na}^+$  を  $\text{K}^+$  に置換し、膜電位を減少させたところ、hOCT2-A 及び hOCT2 発現細胞による TEA 取り込みは顕著に減少した。次に、hOCT2-A 発現

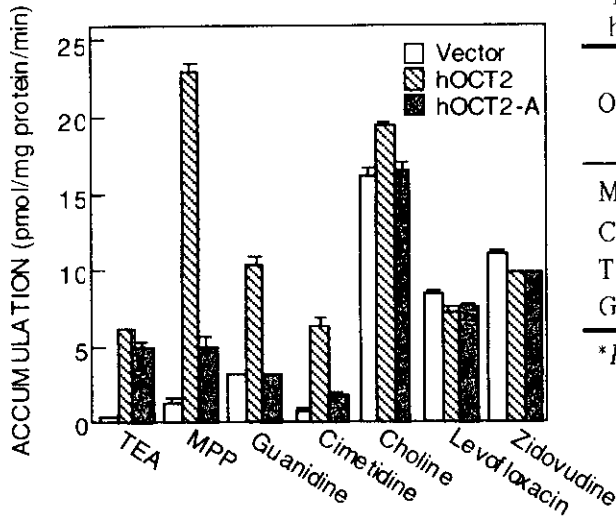


Fig. 7. hOCT2-A 発現細胞による種々カチオン性薬物の取り込み活性.

細胞による種々のカチオン性薬物の取り込みについて、hOCT2と比較精査した。その結果、TEA以外にも、神経毒であるMPPなどの有機カチオンで顕著な取り込み活性の上昇することが観察され、hOCT2-AはhOCT2と同様、構造的に多様な有機カチオンを認識し輸送することが判明した (Fig. 7)。一方、両性イオンであるレボフロキサシン (キノロン系抗菌薬) やPAHでは、hOCT2-A及びhOCT2を介する取り込み活性が認められなかった。また、hOCT2-Aを介するグアニジン (内因性有機カチオン)、シメチジンの取り込みについてはコントロールと比較して上昇傾向が認められるものの、hOCT2と比較して弱く、両トランスポータの基質認識性は異なる可能性が示唆された。次に、hOCT2-Aを介するTEA取り込みに及ぼす種々有機カチオン類の共存阻害の影響についてhOCT2と比較検討した。hOCT2-Aを介するTEA取り込みは、構造的に多様なカチオン性化合物によって阻害された。hOCT2-A及びhOCT2を介するTEA輸送は、ヒスタミン、ドパミンなどの生体モノアミンによって同程度阻害されたが、レボフロキサシンや、プロカインアミド (抗不整脈薬) 及びその代謝物であるN-アセチルプロカインアミド等多数のカチオン性化合物については、hOCT2-Aを介するTEA取り込みがhOCT2と比較して強く阻害された。さらに、これまでの検討からhOCT2-Aと相互作用することが示されたカチオン性化合物について、見かけのKm値、またはTEA輸送に対するIC<sub>50</sub>値を算

Table 1. 取り込み実験から算出した hOCT2 及び hOCT2-A のカチオン性薬物に対する親和性.

Organic cation	Km (mM)	
	hOCT2	hOCT2-A
MPP	0.038 ± 0.002	0.0073 ± 0.0017 *
Cimetidine	0.14 ± 0.03	0.029 ± 0.007 *
TEA	0.25 ± 0.03	0.046 ± 0.009 *
Guanidine	2.6 ± 0.2	0.48 ± 0.06 *

\*P<0.05, significant difference from the Km value of hOCT2.

Table 2. 阻害実験から算出した hOCT2 及び hOCT2-A のカチオン性薬物に対する親和性.

Organic cation	IC <sub>50</sub> (mM)	
	hOCT2	hOCT2-A
Procainamide	1.9 ± 0.2	0.14 ± 0.00 *
NAPA	7.3 ± 0.2	0.14 ± 0.01 *
Levofloxacin	12 ± 1	0.34 ± 0.05 *
NMN	2.7 ± 0.4	0.35 ± 0.06 *
Choline	2.5 ± 0.4	0.39 ± 0.03 *
Dopamine	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.4

\*P<0.05, significant difference from the IC<sub>50</sub> value of hOCT2.

出し、基質親和性をhOCT2と比較した。その結果、ドパミンのhOCT2-A及びhOCT2に対するIC<sub>50</sub>値に有意な違いは認められなかった。一方、その他のカチオン性薬物のhOCT2-Aに対するKm値及びIC<sub>50</sub>値は、hOCT2よりも小さい値を示した (Table 1&2)。以上の結果から、hOCT2のサブライミングバリエーションであるhOCT2-A cDNAの単離に成功した。hOCT2-Aの臓器分布や機能特性について解析を行った結果、hOCT2-Aは腎局在性の有機カチオントランスポータであり、構造的に多様なカチオン性薬物に対し、hOCT2に比べて高い親和性を示すことが判明した。従って、hOCT2-Aはヒトにおけるカチオン性薬物の腎排泄に関わる新規有機カチオントランスポータであることが示唆された。

## 2) ヒト腎正常組織における薬物トランスポータ遺伝子の発現量解析

ヒト腎臓における薬物トランスポータ群miRNAの発現量について有機イオントランスポータ遺伝子ファミリーSLC22A (Table 3)を中心に、リアルタイムPCR法により定量を行った。京都大学医学部附属病院泌尿器科において根治的腎摘除が施行さ



Table 3. 有機イオントランスポータ遺伝子ファミリー (SLC22A) と輸送基質.

Transporter	Substrate
hOAT1 (SLC22A6)	<i>para</i> -aminohippuric acid (PAH), NSAIDs, methotrexate, antiviral agent, diuretics, $\beta$ -lactam antibiotics, ochratoxin A
hOAT2 (SLC22A7)	PAH, methotrexate, salicylate
hOAT3 (SLC22A8)	PAH, methotrexate, ochratoxin A, estrone sulfate, cimetidine
hOAT4	PAH, methotrexate, ochratoxin A, estrone sulfate
hOCT1 (SLC22A1)	tetraethylammonium (TEA), N-methylnicotinamide (NMN), choline, dopamine, 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP <sup>+</sup> )
hOCT2 (SLC22A2)	TEA, NMN, choline, dopamine, MPP <sup>+</sup> , guanidine
hOCT3 (SLC22A3)	TEA, choline, dopamine, MPP <sup>+</sup> , guanidine
hOCTN1 (SLC22A4)	L-carnitine, TEA, quinidine, verapamil
hOCTN2 (SLC22A5)	L-carnitine, TEA

れた腎腫瘍または尿管腫瘍患者の正常腎組織を試料として total RNA を精製した。薬物トランスポータ群の中で有機アニオントランスポータ hOAT3 mRNA の発現量が最も高く、常在遺伝子グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNA の発現量の約 1/20 程度であった (Fig. 8)。また、これまで多様なアニオン性薬物の腎移行に関わる主要なトランスポータとして位置づけられている hOAT1 は hOAT3 に次いで 2 番目の発現量であった (Fig. 8)。さらに、特異抗体を用いたウエスタンブロット解析により、hOAT1 や hOAT3 タンパクはともに腎粗膜画分に発現が認められた。従って、hOAT1 及び hOAT3 はともにアニオン性薬物の腎排泄に主要な役割を果たすことが推察された。有機カチオントランスポータ群では、hOCT2 mRNA の発現量が最も高く、ウエスタンブロットにおいて hOCT2 タンパクの発現も認められたことから多様な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が示唆された。一方、hOCT1 の発現量は極めて低く、本研究において定量を行った 19 種の薬物トランスポータ群で最も低い発現量であることや、ウエスタンブロット解析においてシグナルが認められなかったこと等から、カチオン性薬物の腎移行に及ぼす hOCT1 の影響は小さいことが

推察された。新規有機カチオントランスポータ hOCT2-A の mRNA 発現量は hOCT2 に比べて約 1/10 であり、有機カチオントランスポータ群では 3 番目の発現量であった。有機イオントランスポータファミリーである hOCTN1 及び hOCTN2 の発現量は hOCT2 の約 1/3 程度であり hOCTN1 は 1/10 以下であった。 $\beta$ -ラクタム抗生物質や ACE 阻害薬などのペプチド類似薬物を輸送することが明

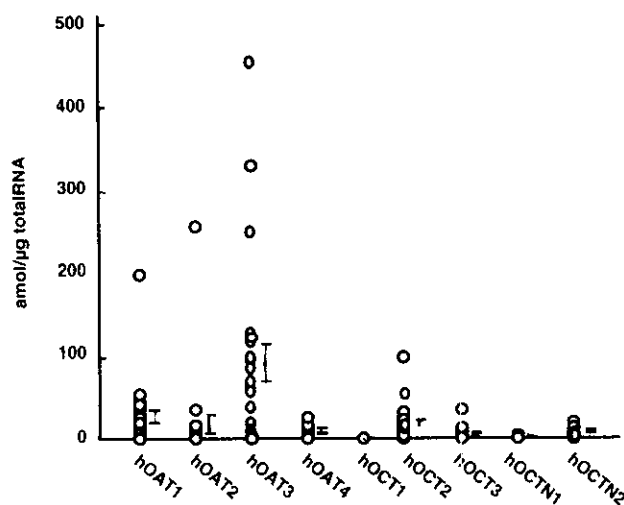


Fig. 8. ヒト腎における有機イオントランスポータファミリー (SLC22A) mRNA の発現量比較.

らかにされているペプチドトランスポータファミリーでは、hPEPT1がhPEPT2に比較して高い発現量を示した。さらに、特異的抗体を用いたウエスタンブロット解析においてhPEPT1及びhPEPT2タンパクはともに腎皮質に発現すること、また免疫組織染色の結果から近位尿細管刷子縁膜に局在することが示された。従って、これらペプチドトランスポータがβ-ラクタム抗生物質やACE阻害剤の腎排泄に関わっていることが示唆された。ATP駆動型有機イオントランスポータ群では抗癌剤やジゴキシンの排泄に関わるMDR1の発現量が最も高く、続いてアニオン性薬物やグルクロン酸抱合体を輸送するMRP1であった。また本年度新たに定量系を構築したMRP6の発現量はATP駆動型有機イオントランスポータ群中5番目であった。高発現を示したhOAT1、hOAT3及びhOCT2について、特異的抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ、これらは全て近位尿細管側底膜に局在することが判明した。従って、これらの有機イオントランスポータ群が協調することにより、薬物の腎取り込み過程は広範な認識特性を示すものと考えられた。

### 3) 腎疾患時における薬物トランスポータ遺伝子の発現変動

腎疾患患者から病理診断目的で採取した腎生検試料の一部を用いてRNAを精製し、薬物トランスポータ群のmRNA発現量を調べた。試料が微量であるため、解析可能な薬物トランスポータは限られたが、定量可能であった薬物トランスポータ群のうちでhOAT1 mRNAの発現量が正常腎組織中と比較し

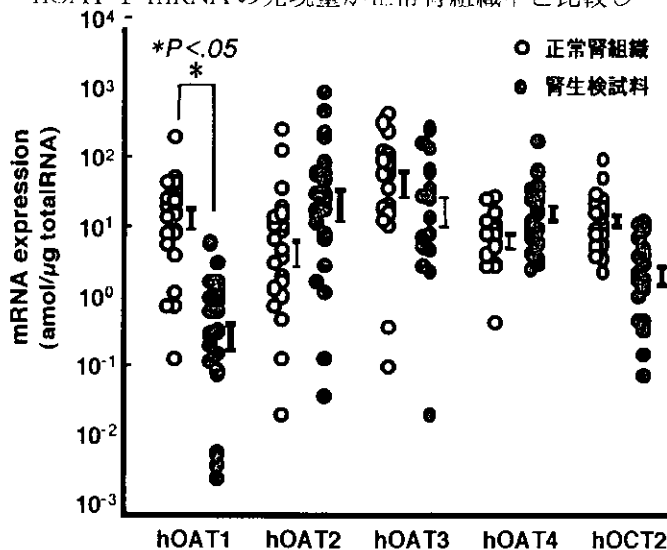


Fig. 9. 腎疾患患者における有機イオントランスポータファミリー (SLC22A) mRNAの発現量比較。

て顕著に低下しており、約1/10まで有意に減少していることが判明した (Fig. 9)。一方、hOAT3やhOCT2など他の薬物トランスポータ mRNAの発現量は正常腎組織に比べて1/2~1/3程度の減少であった。hOAT2及びhOAT4 mRNAの発現量には、腎生検試料と正常腎組織の間に有意な変動はみられなかった。

### 4) 腎疾患時におけるセファゾリンの体内動態

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたヒト血清中セファゾリンの定量系を確立した。腎生検を施行された腎疾患患者に対し感染症予防を目的として投与される抗生剤セファゾリンの血中濃度を測定するため、投与直後と投与1時間後に採血を実施した。採取した血清中のセファゾリン濃度を測定し、体内動態パラメーターを算出した。今回測定を行った腎疾患患者におけるセファゾリンの消失クリアランスは、これまでに報告されている健常人でのクリアランスと比較して有意な差は認められなかった。またセファゾリンの消失速度と相関する臨床検査値も認められなかった。一方、薬物トランスポータ発現量との相関について検討したところ、hOAT3 mRNAの発現量とセファゾリンの消失クリアランスとが正の相関を示すことが示唆された (Fig. 10)。従って、腎機能低下患者ではセファゾリンの腎排泄にhOAT3が密接に関与している可能性が示された。

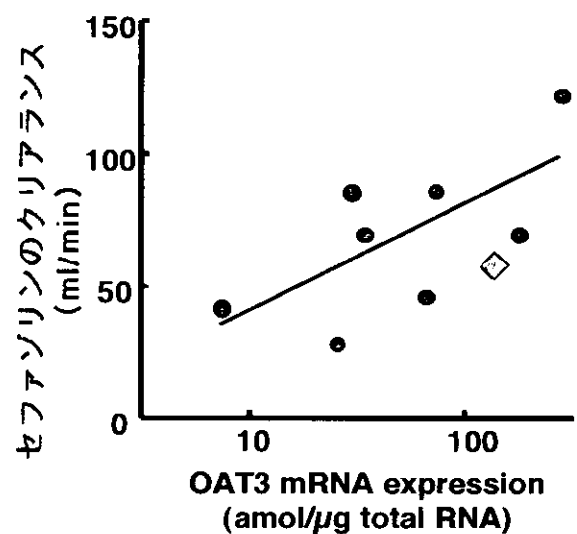


Fig. 10. 腎疾患時におけるセファゾリンの消失クリアランス (CL) と hOAT3 mRNA 発現量との相関。

#### D. 考察

薬剤性腎障害の発症は、多様化が進む薬物療法において増加の一途をたどっている。特に、高血圧、糖尿病、膠原病など多剤併用療法を施行している高齢患者では、薬剤に起因する腎障害が増加しており、予後の回復も不良であるため腎不全など重篤な合併症を起こすことが多く、対策が望まれている。しかしながら、薬剤性腎障害の発症に関わる生体側因子や増悪因子が解明されていないため、薬剤選択や投与計画を立てるうえで適切な対応策がないのが現状である。本年度の研究によって、ヒト腎に発現する主要薬物トランスポータ群（hOAT1、hOCT3、hOCT2等）の薬物認識特性、尿細管分布、細胞膜局在等、個々のトランスポータの機能的、動態学的役割を推察する上で有用な情報を収集・解析することができた。さらに、新規有機カチオントランスポータhOCT2-Aの遺伝子クローニングに成功し、それに基づく組織発現、薬物認識能について解析を実施した結果、ヒト腎に主として発現する有機カチオントランスポータファミリーの新たなメンバーであることを確認することができた。現在、hOCT2-Aに対する特異抗体を作成中であり、免疫組織学的な検討を加えることによって、その生理的意義等についてより詳細な解析が可能になると考える。また、ヒト正常腎組織における薬物トランスポータ群の発現プロファイルについて遺伝子レベル及び蛋白レベルで初めて明らかにした。本研究成果は、アメリカ腎臓学会誌（*J.Am.Soc.Nephrol.*, 2002, 4月号）に掲載の予定である。これまで、hOATやhOCTファミリーのヒト腎における発現分布について比較検討した報告はなく、その生理的意義や薬物動態学的な役割に関しては不明点が多く残されていた。従って、本研究により各々のトランスポータの発現量と尿細管分布が解明されたことにより、それらの薬物腎排泄能との関連について詳細な検討が可能であることがわかった。特に、腎疾患患者から採取した腎生検試料の一部を用いて解析した結果、hOAT1のように発現量の顕著な低下がみられるトランスポータとhOAT3やhOCT3のように発現変動が軽微なトランスポータが存在し、腎障害時に伴う発現変動がトランスポータにより大きく異なることが判明した。また、腎生検試料を用いたトランスポータ発現量解析と同時に、薬剤の排泄能（アニオン性抗生物質セファゾリン等）を測定することにより、個々のトラ

ンスポータ発現との相関について調べることが可能であることが判明した。すなわち、インビトロで得られた情報を考慮して、尿細管薬物トランスポータの生体での機能的役割について解明することができると考えられる。今後更に症例数を増やして腎機能低下・腎障害との相関について解析を進めるとともに、患者毎の薬剤排泄能力と薬物トランスポータ遺伝子発現プロファイルとの関連を精査する必要がある。腎機能低下や腎不全の進展度により、薬物トランスポータの発現変動とそれに伴う薬物排泄機能の変化に個体差の存在することが予想されるため、個体間変動についても統計的手法を用いて検討を加えていく予定である。薬物トランスポータ研究は、腎障害や薬物相互作用の回避を目的とした薬剤分子設計やドラッグデリバリーシステム開発等の創薬関連領域においても一段と研究が競争熾烈化している状況にあるため、知的所有権（特許）取得の観点からも本研究を継続的かつ円滑に実施し、研究成果を臨床での薬物治療計画に可及的かつ速やかに情報還元することが必要である。

#### E. 結論

尿細管トランスポータ群の薬物輸送特性並びに腎疾患時におけるトランスポータ遺伝子の発現変動解析は、薬剤性腎障害における個々トランスポータの機能的役割の解明、並びにそれに基づく至適薬剤投与設計法の基盤確立に有用な情報を提供する。

#### F. 健康危険情報

得られた研究成果の中に、健康危険情報に該当するものはない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1)Kodawara, T., Yano, I., Masuda, S., Ito, T., Wakasugi, H., Futami, T., Hashimoto, Y., Saito, H. and Inui, K.: Interaction of azole antifungal agents with human P-glycoprotein expressed in a kidney epithelial cell line. *Xenobio. Metabol. and Dispos.*, 16(1): 5-11 (2001)
- 2)Matsuo, Y., Yano, I., Habu, Y., Katsura, T., Hashimoto, Y. and Inui, K.: Transport of levofloxacin in the OK kidney epithelial cell line: Interaction with p-aminohippuric acid transport.

- Pharm. Res., 18(5): 573-578 (2001)
- 3)Hashida, T., Masuda, S., Uemoto, S., Saito, H., Tanaka, K. and Inui, K.: Pharmacokinetic and prognostic significance of intestinal MDR1 expression in recipients of living-donor liver transplantation. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 69(5): 308-316 (2001)
- 4)Motohashi, H., Katsura, T., Saito, H. and Inui, K.: Effects of tacrolimus and cyclosporin A on peptide transporter PEPT1 in Caco-2 cells. *Pharm. Res.*, 18(5): 713-717 (2001)
- 5)Takeuchi, A., Masuda, S., Saito, H., Doi, T. and Inui, K.: Role of kidney specific organic anion transporters, OAT-K1 and OAT-K2, in the urinary excretion of methotrexate. *Kidney Int.*, 60(3): 1058-1068 (2001)
- 6)Motohashi, H., Masuda, S., Katsura, T., Saito, H., Sakamoto, S., Uemoto, S., Tanaka, K. and Inui, K.: Expression of peptide transporter following intestinal transplantation in the rat. *J. Surg. Res.*, 99(2): 294-300 (2001)
- 7)Ohnishi, S., Saito, H., Fukada, A., and Inui, K., Independent organic cation transport activity of Na<sup>+</sup>-L-carnitine cotransport system in LLC-PK<sub>1</sub> cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 281(2): F273-F279 (2001)
- 8)Irie, M., Terada, T., Sawada, K., Saito, H., and Inui, K., Recognition and transport characteristics of nonpeptidic compounds by basolateral peptide transporter in Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 298(2): 711-717 (2001)
- 9)Takeuchi, A., Masuda, S., Saito, H., Abe, T., and Inui, K., Multispecific substrate recognition of kidney-specific organic anion transporters OAT-K1 and OAT-K2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299(1): 261-267 (2001)
- 10)Fukatsu, S., Yano, I., Igarashi, T., Hashida, T., Takayanagi, K., Saito, H., Uemoto, S., Kiuchi, T., Tanaka, K. and Inui, K., Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult recipients receiving living-donor liver transplantation. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 57(6-7): 479-484 (2001)
- 11)Sawada, K., Terada, T., Saito, H., and Inui, K., Distinct transport characteristics of basolateral peptide transporters between MDCK and Caco-2 cells. *Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol.*, 443(1), 31-37 (2001)
- 12)Yamaguchi, H., Yano, I., Saito, H., and Inui, K., Transport characteristics of grepafloxacin and levofloxacin in the human intestinal cell line Caco-2. *Eur. J. Pharmacol.*, 431(3): 297-303 (2001)
- 13)Urakami, Y., Okuda, M., Masuda, S., Akazawa, M., Saito, H., and Inui K., Distinct characteristics of organic cation transporters, OCT1 and OCT2, in the basolateral membrane of renal tubules. *Pharm. Res.*, 18(11): 1528-1534 (2001)
- 14)Takahashi, K., Masuda, S., Nakamura, N., Saito, H., Futami, T., Doi, T., and Inui K., Upregulation of H<sup>+</sup>-peptide cotransporter PEPT2 in rat remnant kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 281(6): F1109-F1116 (2001)
- 15)Okabe, H., Yano, I., Hashimoto, Y., Saito, H., and Inui, K., Evaluation of increased bioavailability of tacrolimus in rats with experimental renal dysfunction. *J. Pharm. Pharmacol.*, 54(1): 65-70 (2002)
- 16)Yamaguchi, H., Yano, I., Saito, H., and Inui, K., Pharmacokinetic role of P-glycoprotein in oral bioavailability and intestinal secretion of grepafloxacin in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300(3): 1063-1069 (2002)
- 17)Motohashi, H., Sakurai, Y., Saito, H., Masuda, S., Urakami, Y., Goto, M., Fukatsu, A., Ogawa, O., and Inui, K., Gene expression levels and immunolocalization of organic anion transporters in the human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13(4): in press (2002)
- 18)Ashida, K., Katsura, T., Motohashi, H., Saito, H., and Inui, K., Thyroid hormone regulates the activity and expression of the peptide transporter PEPT1 in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, in press (2002)
- 19)Pan, XY, Terada, T., Irie, M., Saito, H., and Inui, K., Diurnal rhythm of H<sup>+</sup>/peptide cotransporter (PEPT1) in the rat small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, in press (2002)
- 20)Uwai, Y., Saito, H., and Inui, K., Rat renal organic anion transporter rOAT1 mediates

urinary-excreted cephalosporins, but not of biliary-excreted cefoperazone. Drug Metab. Pharmacokinet., in press (2002)

21) Kodawara, T., Masuda, S., Wakasugi, H., Uwai, Y., Futami, T., Saito, H., Abe, T., and Inui, K., Organic anion transporter oatp2-mediated interaction between digoxin and amiodarone in the rat liver. Pharm. Res., in press (2002)

22) 齋藤秀之、乾 賢一. 腎移行・排泄. 「薬物治療の患者個別化へのアプローチ」第1章: ファーマコネティクス・ファーマコダイナミクス2001 2. 分布と排泄のトピックス、澤田康文 他編、月刊薬時2月号臨時増刊号、じほう、第43巻、第3号、p29-34 (2001)

23) 齋藤秀之、乾 賢一. 腎疾患患者への医薬品投与時の注意. 「薬物代謝からみた肝・腎・心疾患患者への医薬品投与時の注意」、中野真汎編、医薬ジャーナル社、p.53-66 (2001)

## 2. 学会発表

1) 齋藤秀之. 有機アニオン・有機カチオントランスポータの薬物認識特性と発現調節. 日本薬学会第121年会: シンポジウム3「薬物輸送・排泄の分子機構」(2001年3月、北海道)

2) Terada, T., Irie, M., Saito, H., and Inui, K., Recognition and transport characteristics of nonpeptidic compounds by basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. EUFEPS World Conference on Drug Absorption and Drug Delivery (June 2000 Denmark)

3) 乾 賢一. 臓器移植における免疫抑制剤の適正使用と遺伝子情報. 情報研鑽科学生物(CBI)学会2001年大会. (2001年7月、東京)

4) 乾 賢一. 薬物トランスポータ研究の新展開: From Bench to Bedside. 第16回日本薬物動態学会年会: シンポジウム主題2「創薬における薬物吸収、分布、排泄研究の現状~DDSからゲノム製剤まで」(2001年9月、神戸)

5) 増田智先. 腎局在性有機アニオン輸送体の構造・機能と薬物動態学的意義に関する研究. 第16回日本薬物動態学会年会: 奨励賞受賞講演 (2001年10月、神戸)

6) 乾 賢一、齋藤秀之. 薬物トランスポータ群の構造・機能解析とオーダーメイド医療への応用. 第23回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2001年11月、熊本)

7) 乾 賢一. 臓器移植患者におけるタクロリムスの適正使用: 体内動態の個人差と遺伝子発現解析. ゲノム創薬フォーラム第4回シンポジウム「ゲノムからプロテオーム創薬へ」(2001年11月、東京)

8) 増田智先. 臓器移植患者におけるタクロリムス体内動態の個人差と小腸P-糖タンパク質発現. 日本薬学会第122年会: シンポジウム7「消化管における薬物代謝・排出輸送系とその機能修飾~薬物の消化管吸収との関連性~」(2002年3月、千葉)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし。

### 2. 実用新案登録

該当なし。

### 3. その他

該当なし。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

薬剤排泄タンパク質群の発現変動と遺伝子多型・変異解析に関する研究

分担研究者 土井 俊夫 徳島大学医学部臨床検査医学講座教授

【研究要旨】高齢者及び腎機能低下患者における薬剤排泄機能と薬物トランスポータ遺伝子発現との相関解析を実施し、高齢患者の薬物治療・投与計画における薬物トランスポータ遺伝子発現情報の有用性と臨床的意義について明らかにする。

A. 研究目的

高齢者および腎障害をきたしている患者における薬物応答性並びに薬物動態を明らかにするため、腎生検組織を用い薬物トランスポータの発現解析を実施し、各種パラメーターと比較検討し、その臨床的意義を明らかにした。

B. 研究方法

(1) 各種腎疾患（IgA腎症、微小変化型ネフローゼ症候群、巣状糸球体硬化症、膜性腎症、膜性増殖性腎炎、慢性腎炎、間質性腎炎、ループ腎炎など）の29症例の腎生検組織より採取し、各種薬物トランスポータのmRNA発現量を測定した。またそれらを各種パラメーターと比較検討した。また、腎機能はクレアチニンクリアランス（CLcr）およびPSP試験により評価した。

（倫理面への配慮）

徳島大学医学部附属病院病院倫理小委員会において、平成12年8月29日付けで承認を受けた。課題

名「腎に発現する薬物輸送体の発現定量と遺伝子解析に関する臨床研究（受付番号33号）。患者に説明し文書で承諾を得た。

(2) 薬物動態に及ぼす因子を解析する目的で腎生検前の朝にセファゾリンを静注投与し、投与後採血し、消失クリアランスを算出した。

C. 研究結果

腎生検組織における薬物トランスポータ群のmRNA発現解析は研究代表者との共同により実施し、結果については総括研究報告書（Fig.9）に一括して記載した。アニオン性薬物の腎排泄に関わるhOAT1の遺伝子発現が正常腎組織に比較して顕著に低下していることが判明した。

腎疾患患者におけるセファゾリンの消失クリアランスは、健常人で報告されているクリアランス値と比較して有意な差は認められなかった。アニオン性薬物を認識するトランスポータについて、mRNA発現量とセファゾリンクリアランスとの相

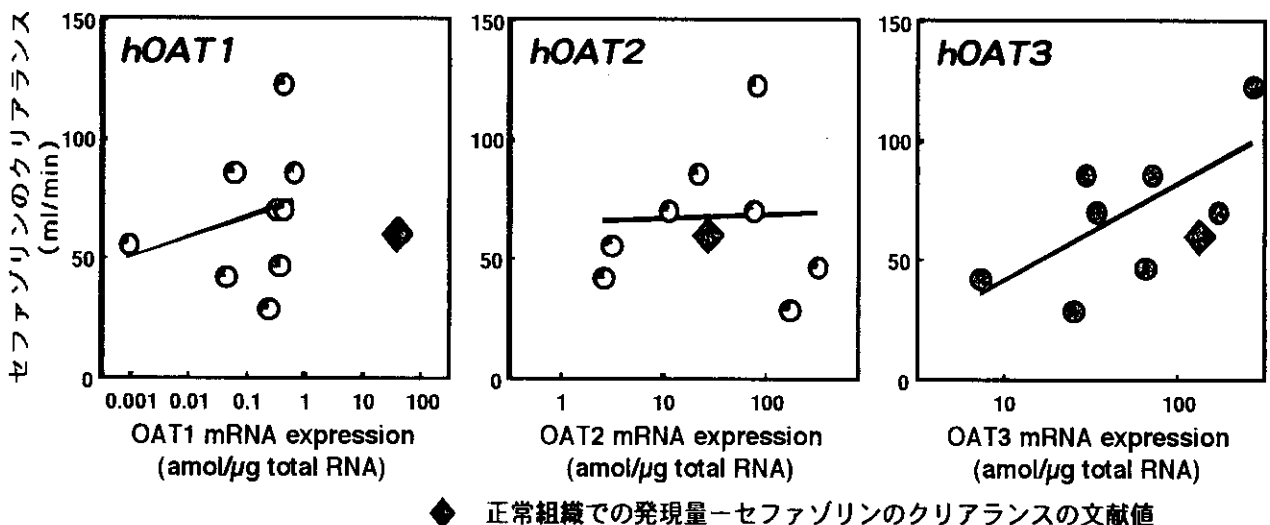


Fig. 1. 腎疾患患者におけるセファゾリン消失クリアランスとhOAT1、hOAT2及びhOAT3 mRNA発現量との相関。

関について検討した。その結果、hOAT1 や hOAT2 の mRNA 発現量とセファゾリンクリアランスとの間に相関はみられなかったが、hOAT3 mRNA の発現量とセファゾリンクリアランスとが正の相関を示すことが示唆された (Fig. 1)。従って、腎疾患患者ではセファゾリンの腎排泄に hOAT3 が関与している可能性が示唆された。

#### D. 考察

腎疾患患者から採取した腎生検組織の一部を用いて薬物トランスポータ遺伝子の発現変動について解析を試みた結果、hOAT1 発現量に顕著な低下が認められたが、hOAT2、hOAT3 や hOCT3 のように腎疾患患者においても遺伝子発現変動が小さいトランスポータが存在することが判明した。腎生検試料は IgA 腎症、微小変化型ネフローゼ症候群、巣状糸球体硬化症、膜性腎症、膜性増殖性腎炎、慢性腎炎、間質性腎炎、ループ腎炎など多様な腎疾患を呈する患者群から採取したものであり、今後症例数を増やし、疾患毎にこれら薬物トランスポータの遺伝子発現変動を精査する必要があると考えられる。さらに、腎生検試料を用いたトランスポータ発現量解析と同時に、同一患者における薬剤排泄機能（アニオン性抗生物質セファゾリン等）を測定し相関解析を実施することにより、尿細管トランスポータ群の薬物動態学的役割について究明することが可能と推察される。今後更に、腎機能低下・腎障害との相関について解析を進めるとともに、薬剤排泄機能と薬物トランスポータの遺伝子発現プロファイルとの対応を比較精査することが必要と考えられる。各種腎疾患や腎不全の進展度により、薬物トランスポータの発現変動並びに薬物排泄機能に個体差の存在することが想定されることから、個体間変動についても統計的手法を用いた検討が必要である。

#### E. 結論

腎疾患時におけるトランスポータ遺伝子の発現変動解析は、薬物腎排泄における個々トランスポータの動態学的役割、薬剤性腎障害における発症・増悪因子としての役割を解明するうえで重要であり、患者個々の薬剤腎排泄機能を考慮した薬剤投与計画の構築に有用な情報を提供する。

#### F. 健康危険情報

現時点では特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Imabayashi, T., Iehara, N., Takeoka, H., Yanagita, M., Kataoka, H., Nishikawa, S., Sano, H., Yokode, M., Fukatsu, A., Kita, T. and Doi, T. Expression of basic helix-loop-helix proteins in the glomeruli. *Clin. Nephrol.*, 55: 53-58 (2001)
- 2) Murakami, T., Otani, S., Horijoh, T., Doi, T. and Shima, K. Influence of the presence of OB-Re on leptin radioimmunoassay. *J. Endocrinol.*, 168: 79-86 (2001)
- 3) Doi, T. The contribution of mesangial cell proliferation to progressive glomerular injury. *J. Med. Invest.*, 48: 1-4 (2001)
- 4) Yanagita, M., Arai, H., Nakano, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Varnum, B., Fukatsu, A., Doi, T. and Kita, T. Gas6 regulates mesangial cell proliferation through Axl in experimental glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.*, 158: 1423-1432 (2001)
- 5) Mizuno, A., Murakami, T., Doi, T. and Shima, K. Effect of leptin on insulin sensitivity in the Otsuka long-Evans Tokushima fatty rat. *Regulatory Peptides*, 99: 41-44 (2001)
- 6) Makibayashi, K., Tatematsu, M., Hirata, M., Fukushima, N., Kusano, K., Ohashi, S., Abe, H., Kuze, K., Fukatsu, A., Kita, T. and Doi, T. A vitamin D analog ameliorates glomerular injury on rat glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.*, 158: 1733-1741 (2001)
- 7) Yamamoto, Y., Kato, I., Doi, T., Yonekura, H., Ohashi, S., Takeuchi, M., Watanabe, T., Yamagishi, S., Sakurai, S., Takasawa, S., Okamoto, H. and Yamamoto, H. Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *J. Clin. Invest.*, 108: 261-268 (2001)
- 8) Takeuchi, A., Masuda, S., Saito, H., Doi, T. and Inui, K. Role of kidney-specific organic anion transporters in the urinary excretion of methotrexate. *Kidney Int.*, 60: 1058-1068 (2001)
- 9) Yanagita, M., Arai, H., Nakano, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Fukatsu, A., Doi, T. and Kita, T. Gas6 induces mesangial cell proliferation via latent transcription factor STAT3. *J. Biol.*

Chem., 276: 42364-42369 (2001)

10) Takahashi, K., Masuda, S., Nakamura, N., Saito, H., Futami, T., Doi, T. and Inui, K. Upregulation of H<sup>+</sup>-peptide cotransporter PEPT2 in rat remnant kidney. Am. J. Physiol. Renal Physiol., 281: F1109-F1116 (2001)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし。
2. 実用新案登録  
該当なし。
3. その他  
該当なし。



厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

加齢・薬剤性腎障害に伴う薬剤排泄タンパク質の免疫組織学的解析に関する研究

分担研究者 深津 敦司 京都大学医学部附属病院人工腎臓部講師

【研究要旨】ヒト正常腎及び病腎組織における薬物トランスポータの分布並びに膜局在について免疫組織学的解析を実施した。ヒト正常腎において有機カチオントランスポータ hOCT1、hOCT2 及び有機アニオントランスポータ hOAT3 は近位尿細管の側底膜に発現がみられたが、局在部位に相違点が認められた。有機アニオントランスポータ hOAT1 はさらに限局された尿細管に発現すること、ペプチドトランスポータ PEPT2 は尿細管刷子縁膜に強い発現をみとめた。病腎では疾患やその程度によりトランスポータ発現部位の変化がみられた。

#### A. 研究目的

薬剤、加齢に関する薬物トランスポーターの腎内での発現変化を調べるにあたり、薬剤性腎症の腎生検例が現時点では少ないため、本年度は各種腎疾患が薬物トランスポーターの発現に及ぼす影響について免疫組織化学的手法により検討した。

#### B. 研究方法

既知の薬物トランスポーターである有機カチオントランスポータ OCT1 及び OCT2、有機アニオントランスポータ OAT1 及び OAT3、ペプチドトランスポータ PEPT2 の部分配列ペプチドを家兔に免疫し、特異抗体を作成した。各抗体の特異性は抗原ペプチドによる吸収試験により確認した。比較的症例数の得られた IgA 腎症、微小変化群、巣状糸球体硬化症の腎生検凍結標本を用い、各種薬物トランスポーターの局在について特異抗体による間接免疫蛍光抗体法により調べた。

（倫理面への配慮）

本研究計画の実施（血液及び腎生検試料の一部を用いた薬物トランスポータ遺伝子の発現並びに遺伝多型・変異解析）にあたり、「腎に発現する薬物輸送体の発現量定量と遺伝子解析に関する臨床研究」の題目で京都大学医学研究科・医学部医の倫理委員会より平成12年8月23日に承認書が交付されている。実施に際し患者に説明し文書で承諾を得た。

#### C. 研究結果

まず正常腎と考えられる、腎腫瘍患者より摘出された腎の腫瘍より可能な限り遠位部より得た組織（組織学的にも病変がみられないことを確認）では

hOCT1 発現がコントロールと比べほとんど変化を認めなかった。また mRNA の発現の多かった hOAT1、hOAT3、hOCT2 は近位尿細管に高濃度に局在した。病腎における薬物トランスポータの発現については hOCT1 はほとんどの症例で発現はみられなかったが IgA 腎症の一部の尿細管（主として近位尿細管と考えられる）には局在がみられたが組織学的変化との比較はできなかった。また微小変化群の一部で近位尿細管の一部と糸球体のボウマン嚢上皮および系蹄壁にも発現がみられ高度蛋白尿の影響による刺激が想定された。hOCT2 については正常腎と同様に、病腎においてもほとんどの例で近位尿細管において強い発現が認められた。しかし間質の障害部位では発現が減弱しており正常腎に比べ生検腎での hOCT2 mRNA の発現量が減弱しているのはこれを反映している可能性がある。興味深いことに IgA 腎症や巣状糸球体硬化症では糸球体では hOCT2 の局在がみられないが微小変化群の一部ではボウマン嚢上皮を含めた糸球体で hOCT2 の局在がみられ (Fig. 1A)、この疾患が糸球体の上皮細胞の異常が想定されていることを考えあわせると、この疾患の発症機序に何らかの役割を果たしている可能性がある。hOAT1 については正常腎では近位尿細管に広範囲に局在がみられたが IgA 腎症では局在の減弱が認められた (Fig. 1B)。とくに間質障害が強いと考えられる部位の発現が減弱していた。微小変化群および巣状糸球体硬化症では正常とほとんど差が認められなかった。hOAT3 については正常腎、病

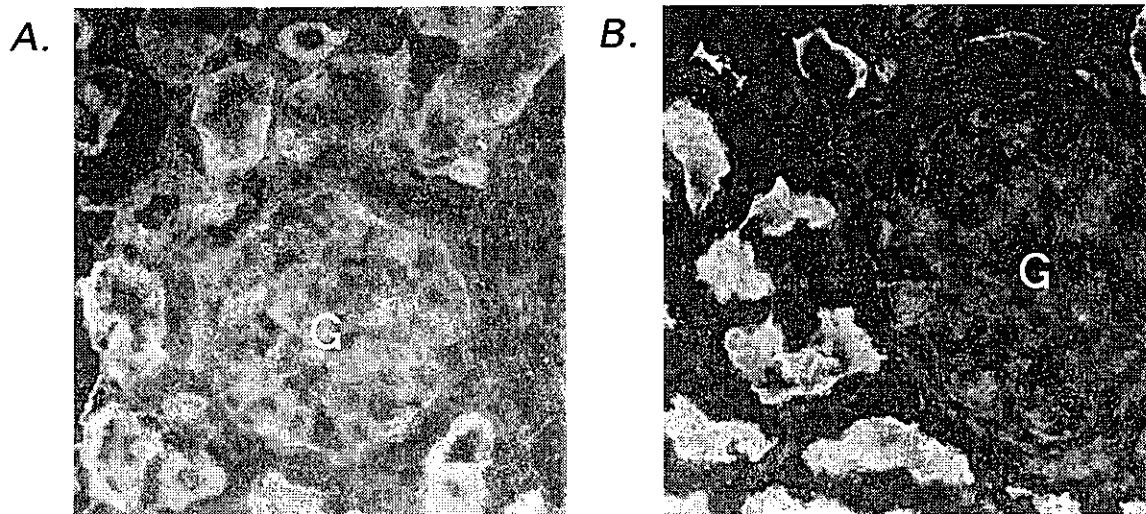


Fig. 1. 微小糸球体病変に伴う hOCT2 (A) 及び hOAT1 (B) の発現分布. G、糸球体.

腎ともに近位尿細管に局在が認められた。

#### D. 考察

正常腎と病腎における薬物トランスポータの発現は mRNA の発現の所見を裏付けるものであった。しかし hOAT1 及び hOCT2 は局所的には高度の発現が認められており、全体的には発現量は病腎で減弱しているが局所的には発現が保たれている部位がありこの部位の尿細管に過剰な負荷がかかっている可能性がある。また糸球体でのトランスポータの発現の意義については糸球体腎炎の発症、進展の機序との関連も含めて今後検討していく。

#### E. 結論

腎における薬物トランスポータはそれぞれ尿細管分布と膜局在が異なり、疾患や病態の進展度により発現分布に変化が生じていることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

現時点では特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Imabayashi, T., Iehara, N., Takeoka, H., Yanagita, M., Kataoka, H., Nishikawa, S., Sano, H., Yokode, M., Fukatsu, A., Kita, T. and Doi, T. Expression of basic helix-loop-helix proteins in the glomeruli. *Clin. Nephrol.*, 55: 53-58 (2001)  
1423-1432 (2001)

- 2) Yanagita, M., Arai, H., Nakano, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Varnum, B., Fukatsu, A., Doi, T. and Kita, T. Gas6 regulates mesangial cell proliferation through Axl in experimental glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.*, 158: 3) Makibayashi, K., Tatematsu, M., Hirata, M., Fukushima, N., Kusano, K., Ohashi, S., Abe, H., Kuze, K., Fukatsu, A., Kita, T. and Doi, T. A vitamin D analog ameliorates glomerular injury on rat glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.*, 158: 1733-1741 (2001)
- 4) Yanagita, M., Arai, H., Nakano, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Fukatsu, A., Doi, T. and Kita, T. Gas6 induces mesangial cell proliferation via latent transcription factor STAT3. *J. Biol. Chem.*, 276: 42364-42369 (2001)
- 5) Motohashi, H., Sakurai, Y., Saito, H., Masuda, S., Urakami, Y., Goto, M., Fukatsu, A., Ogawa, O., and Inui, K., Gene expression levels and immunolocalization of organic anion transporters in the human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13(4): in press (2002)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし。
2. 実用新案登録  
該当なし。
3. その他  
該当なし。

# 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

## 分担研究報告書

### 腎不全・腎腫瘍における薬剤排泄タンパク質群の遺伝子発現解析

分担研究者 小川 修 京都大学大学院医学研究科器官外科学講座教授

【研究要旨】腎癌では、化学療法や放射線治療はほとんど無効であり、転移性、再発性腎癌の治療は免疫療法が中心である。腎細胞癌が化学療法抵抗性を示す機序のひとつとして、癌細胞の多剤耐性化が指摘されており、特に抗癌剤の細胞外汲み出しを担うATP駆動型薬物トランスポータ群の過剰発現が認められている。本研究では、腎腫瘍組織に発現する薬物トランスポータ群の遺伝子発現タイピングについて検討を行った。従来、種々の抗癌剤耐性癌細胞において関連が示唆されていたMDR1/P-糖タンパク質のmRNA発現量は今回測定した17症例全てにおいて低下しており、正常腎組織の約15%程度であった。またMRP1の発現量は正常組織とほぼ同程度であった。腎腫瘍組織において発現亢進が報告されているMRP2は2症例において正常腎組織に比べて2倍以上の亢進が認められたが、平均では正常腎組織とほぼ同程度の発現量であった。一方、エトポシドなどの抗癌剤を輸送するMRP3は17症例中8症例において2倍以上の発現亢進が認められ、他の9症例においても発現量が亢進していることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

一般的に腎細胞癌は抗癌剤を用いた化学療法に強い抵抗性を示すが、その要因のひとつとしてMDR1/P-糖タンパク質やMRP1等のATP駆動型薬物トランスポータの過剰発現による抗癌剤の能動的な汲み出し（排出）輸送が想定されている。一方、腎細胞癌において抗癌剤排出に関わる薬物トランスポータの発現プロファイルや誘導機構については不明点が多く、腎細胞癌の抗癌剤耐性との関連についても未解明である。さらに、既に遺伝子同定されたMRPファミリー（MRP1-6）についても、腎細胞癌における発現並びに抗癌剤耐性獲得機序との関連に関する情報はほとんど無いのが現状である。本研究では腎腫瘍組織における薬物トランスポータ群の遺伝子発現タイピングを行い、抗癌剤耐性との関連について解析することを目的とする。

#### B. 研究方法

京都大学医学部附属病院泌尿器科において根治的腎摘除が施行された腎腫瘍患者の正常及び腎腫瘍組織部を試料として用いた。試料組織よりRNAを精製し、各薬物トランスポータmRNAの発現量をリアルタイムPCR法によって測定した。また、試料組織より精製した粗膜画分を用いウエスタンブロット法によりトランスポータタンパクの発現量についても検討を行った。

#### （倫理面への配慮）

摘出腎組織を用いた薬物トランスポータ遺伝子の発現並びに多型・変異解析については、「腎機能不全に関わる尿細管解毒システムの遺伝子解析に関する臨床研究」の題目で京都大学医学研究科・医の倫理委員会より平成13年3月28日に承認書が交付されている。実施に際し、患者に説明し文書で承諾を得た。

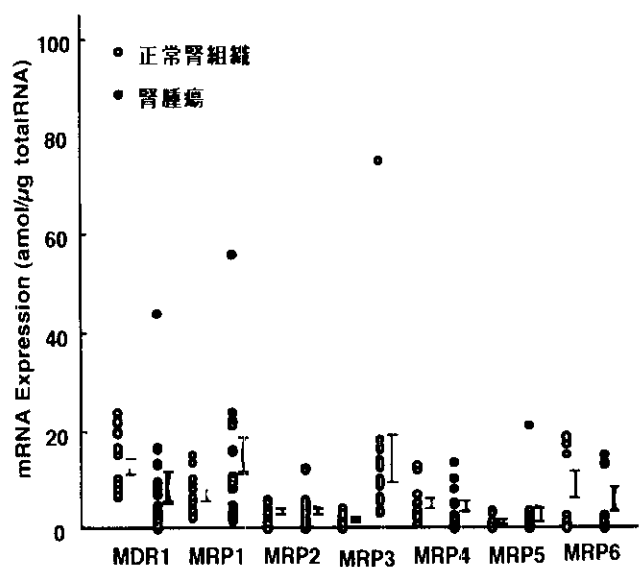


Fig. 1. 正常腎組織及び腎腫瘍組織におけるATP駆動型薬物トランスポータの遺伝子発現。

### C. 研究結果

従来より種々の抗癌剤耐性機序との関連が指摘されていたMDR1のmRNA発現量は今回測定した17症例全てにおいて低下しており、平均で正常組織の約15%程度であった (Fig. 1)。またMRP1のmRNA発現量は正常腎組織とほぼ同程度であった。腎腫瘍組織において発現亢進が報告されているMRP2は2症例において正常腎組織と比較し2倍以上の亢進が認められたが、平均では正常腎組織とほぼ同程度の発現量であった。一方、エトポシドなどの抗癌剤を輸送することが知られているMRP3は17症例中8症例において2倍以上の発現亢進が認められ、14症例において正常腎組織より発現量が上昇していることが判明した。また平均では約4.7倍の発現亢進であった。さらに、ウエスタンブロット解析を実施した結果、MDR1、MRP1、MRP2、MRP3の各タンパク質の発現変動はmRNA発現変動と対応することが示唆された。

### D. 考察

癌化学療法において、治療経過中の抗癌剤耐性細胞の出現は、一つの大きな障害となっている。近年導入された分子生物学的アプローチにより、複数の抗癌剤に抵抗性を示す、いわゆる多剤耐性 (multidrug resistance: MDR) の責任分子として、P糖タンパク質、MRP (multidrug-resistance associated protein) とそのfamily分子 (MRP1~6)、DNA topoisomerase 1、2 およびグルタチオン・S-トランスフェラーゼ (glutathione S-transferase; GST) などが次々と明らかにされた。特に、抗癌剤を細胞内より外へ汲み出すポンプ機能をもつP糖タンパク質は、癌細胞の薬剤耐性獲得との関連において多大な注目を集めてきた。P糖タンパク質はヒトMDR1遺伝子の産物であり、1280個のアミノ酸からなる膜蛋白で、2つのATP-binding cassette 配列 (Walker A、B配列) を持つことから、ATP-binding cassette superfamily (ABC family) に属する。1992年には、同じABC familyに属するMRP1が単離され、P糖タンパク質のみでは説明できなかった多剤耐性と関連することが示唆されている。抗癌剤耐性には薬物トランスポータを含め複数の責任分子が関わっていることが想定されているが、実際の臨床治療においては、どの分子が最も抗癌剤感受性に影響を与えているか、見出すことが重要

と考えられる。そのため本研究では、外科的に切除された腎腫瘍組織におけるMDR1及びMRP1-6の発現量について比較検討した結果、MDR1のmRNA発現量は今回測定した17症例全てにおいて低下しており、正常腎組織の約15%程度であった。またMRP1の発現量は正常腎組織とほぼ同じであった。腎腫瘍組織において発現亢進が報告されているMRP2は、2症例において正常腎組織に比べて2倍以上の亢進が認められたが、平均では正常腎組織とほぼ同程度の発現量であった。一方、MRP3は17症例中8名の患者において2倍以上の発現亢進が認められ、他の9症例においても発現量が亢進していることがわかった。本研究結果は、腎細胞癌の抗癌剤耐性獲得機序を解明し、治療成績の向上が期待されている免疫療法と化学療法との併用療法における薬剤選択基準や耐性克服法を確立する上で有用な基礎情報を提供するものと考えられる。

### E. 結論

腎腫瘍においてMRPファミリーの一員であるMRP3の遺伝子発現が亢進していることが明らかとなった。今後さらに解析症例数を増やして薬物トランスポータ群の遺伝子発現タイピングに関する情報を収集するとともに、MRP3を中心としたABCトランスポータファミリーの抗癌剤認識特性、特異的阻害剤のスクリーニング、発現誘導の分子機構等を解明することにより、腎細胞癌の診断・治療への応用・展開が可能になると期待される。

### F. 健康危険情報

現時点では特にない。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kamba, T., Higashi, S., Kamoto, T., Shisa, H., Yamada, Y., Ogawa, O. and Hiai, H. Failure of ureteric bud invasion: a new model of renal agenesis in mice. *Am. J. Pathol.*, 159(6): 2347-2353 (2001)
- 2) Mizutani, Y., Wada, H., Ogawa, O., Yoshida, O., Fukushima, M., Nonomura, N. and Miki, T. Prognostic significance of thymidylate synthase activity in bladder carcinoma. *Cancer*, 92(3): 510-518 (2001)