

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H12-ゲノム-019)

平成14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15（2003）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	—————	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	—————	10
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	—————	13
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 小川 修	—————	16
III 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	19
IV 研究成果の刊行物・別刷	—————	20

# 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	前京都大学医学部附属病院助教授・副薬剤部長 (現熊本大学医学部附属病院教授 薬剤部長)
	奥田 真弘	京都大学医学部附属病院助教授 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	京都大学医学部附属病院薬剤部・助手
	浦上 裕美子	日本学術振興会特別研究員

#### 【研究要旨】

一般に、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高くなり、さらに予後不良であることか高齢者における薬物療法上の深刻な問題点となっている。また、腎尿細管に発現する薬物輸送体（薬物トランスポータ群）は効率的な薬物腎排泄に関わる。そこで、本研究ではヒト腎に発現する薬物トランスポータ群の機能特性、腎疾患時における発現量変動、並びに薬物体内動態との相関について検討を加えた。

临床上、高齢者に汎用される薬物について有機イオントランスポータ群による輸送特性について検討した。その結果、 $H_2$ 受容体拮抗薬であるファモチジンがhOAT3によって輸送され、循環血管中から腎組織中への移行がhOAT3によって媒介されることか示唆された。また非ステロイド性抗炎症薬が、臨床血中濃度でhOAT1及びhOAT3を介したメトトレキサート輸送を阻害することを明らかにし、薬物相互作用の一要因と考えられることを示した。さらに、腎機能検査薬として用いられているフェノールスルホンフタレインが、hOAT3によって輸送されることを初めて明らかにした。正常腎皮質部の薬物トランスポータ発現量について精査したところ、有機アニオントランスポータhOAT3の発現量が最も高く、次いでhOAT1であった。また有機カチオントランスポータ群ではhOCT2の発現量が最も高く、カチオン性薬物の腎移行に主要な役割を果たしていると考えられた。一方、腎疾患時にはhOAT1発現量が正常腎組織部と比較して有意に低く腎機能低下時にはhOAT1を介した尿細管分泌が低下する可能性が示唆された。腎生検施行後、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し、体内消失速度を算出したところ、セファゾリンの消失速度はクレアチニンクリアランスよりもフェノールスルホンフタレイン試験値と高い相関を示した。従って、糸球体濾過速度に加えて尿細管分泌を考慮することで、薬物排泄能を精度よく予測することが可能になると考えられた。また、セファゾリンの腎分泌速度とhOAT3発現量との間に有意な正の相関を見出し、さらにhOAT3かセファゾリンとフェノールスルホンフタレインを基質として輸送することを明らかにしたことから、腎疾患患者においてはhOAT3発現量がセファゾリンの尿細管分泌能を規定する因子である可能性を示した。以上より、薬物トランスポータの基質認識特性並びに発現変動情報をもとに薬物の腎移行並びに尿細管分泌を予測することで、従来よりも精度の高い投与設計が可能になると考えられた。これらの結果は、患者個々に応じた至適薬剤投与設計法、即ちテーラーメイド薬物治療の基盤確立に有用な情報を提供するものである。

#### 【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因・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因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方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。さらに腎機能低下時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、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。

#### 1 ヒト型薬物トランスポータの遺伝子同定と機能解析

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、腎臓に高い発現が認められた OAT や OCT ファミリーのヒトホモログを腎 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や、遺伝子導入培養細胞発現系などを用いて輸送機能特性について検討した。また、ヒト正常腎組織中への薬物取り込みを検討するため、根治的摘除術が施行された腎・尿管腫瘍患者の正常腎組織より切片を作製し、薬物の組織中への取り込みについて検討した。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子多型・変異に関する解析

腎疾患及び腎・尿管腫瘍などの疾患を有する患者を対象として、腎組織に発現する各薬物トランスポータ群の発現レベルに関する情報を収集した。さらに、腎生検施行後、感染症予防を目的として投与されている抗生剤セファゾリンの排泄速度を算出し腎機能検査値並びに各薬物トランスポータ発現レベルとの関連性についての検討を行った。以上の研究は分担研究者である徳島大学 土井と共同で行った。

hOCT1 及び hOCT2 遺伝子多型は Masscode Tag 法を用いて、また MDR1 遺伝子多型は PCR-RFLP 法にて行い、遺伝子多型と発現量との相関について検討した

(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子多型・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日に指針書が交付されている。さらに平成13年3月29日の「ヒトゲノム・

遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、実施期間を遡って再度承認申請し、平成14年11月20日付けて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。また、腎障害性薬物の腎組織移行に関する解析は「ヒト組織を用いた薬剤性臓器障害発現機序の解明と薬剤毒性スクリーニング法開発に関する研究」として平成14年8月20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機能解析

本年度は最終年度であることから、臨床上高齢患者に対して汎用される腎排泄型薬物の輸送特性について検討した。

#### H<sub>2</sub>拮抗薬の腎排泄に関わる薬物トランスポータ

ファモチジンは他の H<sub>2</sub> 拮抗薬シメチジン等と比較して副作用発現の頻度が低いこと、また代謝酵素などを介した薬物相互作用が認められないことから、臨床で汎用されている。一方、高齢者などの腎機能低下時には、薬物排泄が遅延し、血中濃度が上昇するため副作用が発現する危険がある。近年、シメチジンが腎有機イオントランスポータによって輸送されることが示され、これらか腎分泌に深く関与することが示唆されている。しかし、ファモチジンの腎排泄に関わる薬物トランスポータは明らかにされていない。そこで主要な腎有機イオントランスポータ hOAT1、hOAT3 及び hOCT2 についてファモチジンの輸送能を検討した。ファモチジンは

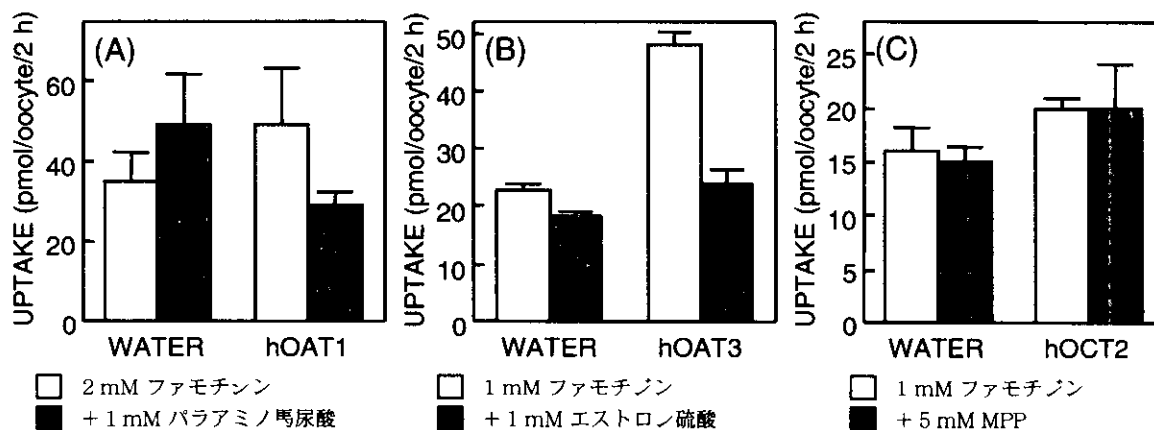


Fig 1 有機イオントランスポータ hOAT1(A)、hOAT3(B)、hOCT2(C)によるファモチジン輸送

hOAT1 によるアニオン輸送を阻害せず、また hOAT1 によっても輸送されなかった (Fig 1A)。一方、hOAT3 によるエストロン硫酸輸送をファモチジンは濃度依存的に阻害し、また hOAT3 発現卵母細胞への取り込みはコントロールと比較して有意に高かった (Fig 1B)。hOAT3 はカチオン性薬物シメチジンを輸送することが知られており、これまで有機アニオントランスポータとされてきたもののアニオン性及びカチオン性の両薬物を認識し輸送すると考えられた。またファモチジンは hOCT2 によるカチオン輸送を濃度依存的に阻害したものの、hOCT2 発現卵母細胞への有意な取り込みは観察されなかった (Fig 1C)。従ってファモチジンは hOCT2 によって輸送される可能性は低いと考えられた。

・抗癌剤メトトレキサートと非ステロイド性抗炎症薬との薬物相互作用

ホジキン病に対しメトトレキサート療法が施行された患者において、非ステロイド性抗炎症薬ロキソプロフェンとの相互作用によるメトトレキサート血中濃度上昇が疑われる症例を経験した。メトトレキサート及びロキソプロフェンは共に腎排泄型薬物であり、アニオン輸送体によって尿細管分泌が媒介されている。従って、腎薬物トランスポータのメトトレキサートとロキソプロフェンとの薬物相互作用への関与について検討した。なお、ロキソプロフェンはプロドラックであり、活性代謝物である trans-OH 体となり薬効を発揮する。従って、本研究では trans-OH 体についても併せて解析を行った。正常

腎組織切片へのメトトレキサート取り込みはロキソプロフェン及びその活性代謝物である trans-OH 体共存によって顕著に低下し、主要排泄経路である腎臓への移行量が低下することによって、血中濃度が上昇すると考えられた。また卵母細胞発現系を用いた解析の結果、メトトレキサートが hOAT1 及び hOAT3 によって輸送されること、さらにロキソプロフェンや trans-OH 体が臨床血中濃度と同程度の濃度でメトトレキサート輸送を阻害することを見出した。さらに他の NSAID も同等にメトトレキサート輸送を阻害した (Fig 2)。以上の結果から、臨床で認められたメトトレキサートとロキソプロフェンの薬物相互作用には hOAT1 及び hOAT3 が深く関与することが示唆された。

セファゾリン及びフェノールスルホブタレインの有機アニオントランスポータによる輸送

分担研究者らとの解析により hOAT3 の発現量がセファゾリンの消失速度並ひに見かけの腎分泌クリアランスと有意な相関が認められることが示された (後述)。従って腎臓での発現が最も高く、尿細管側底膜でのアニオン輸送に重要な役割を担っている hOAT3 によるセファゾリンの輸送について hOAT1 と比較しながら検討を進めた。また、セファゾリンの消失速度とフェノールスルホブタレイン (PSP) 試験の結果とが良好な相関を示すことから、PSP の輸送についても検討した。ヒト胎児腎由来培養細胞 HEK293 細胞に hOAT3 及び hOAT1 を発現させ、セファゾリンと PSP の輸送について検討した。セファゾリン及び PSP は共に hOAT1 及

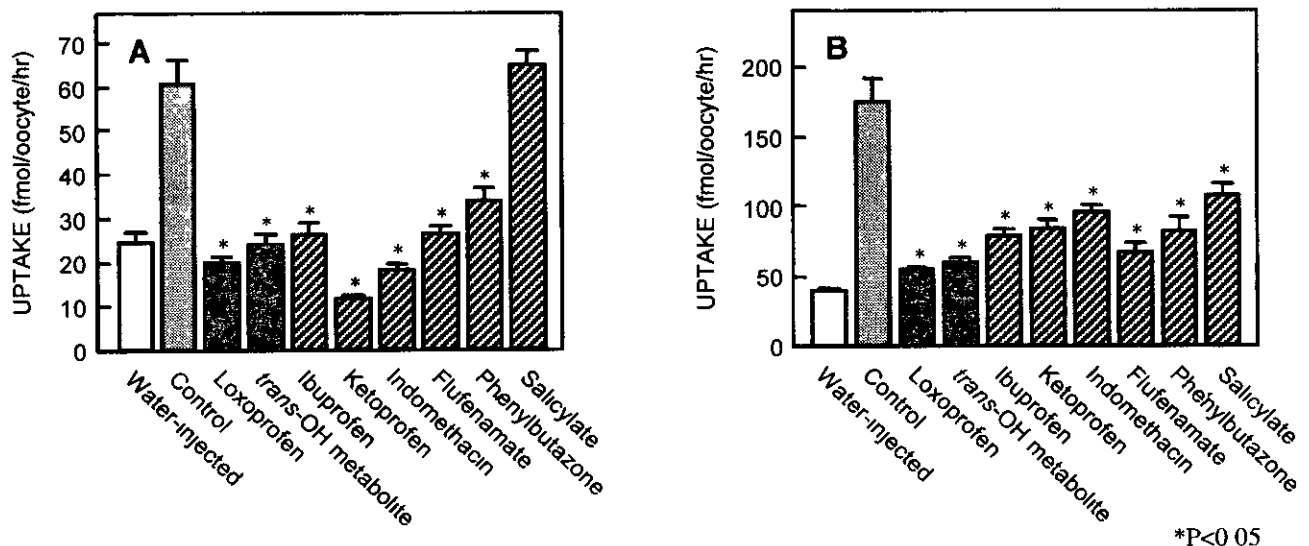


Fig 2 hOAT1(A)及び hOAT3(B)を介したメトトレキサート輸送に及ぼす各種NASIDの阻害効果

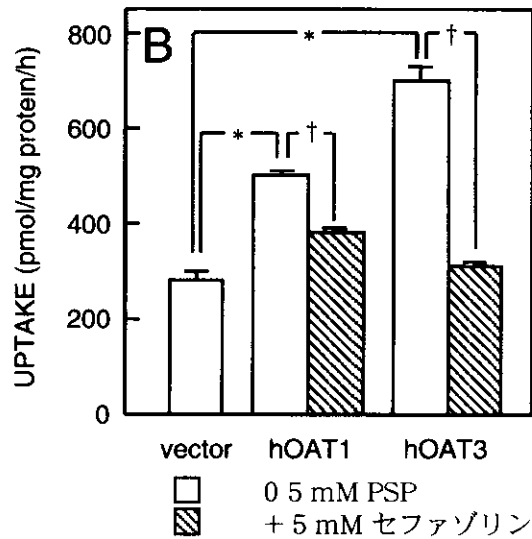
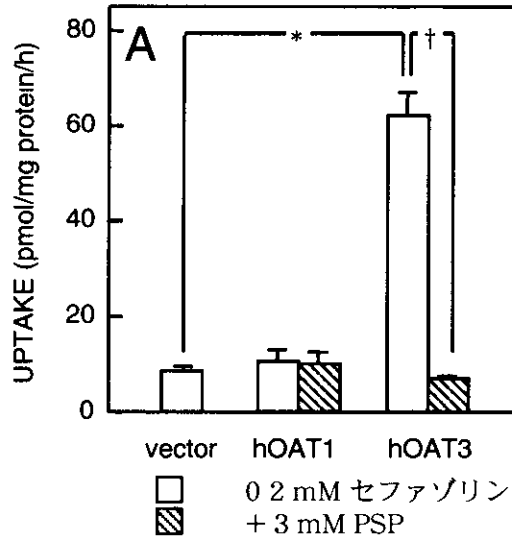


Fig 3 hOAT1 及び hOAT3 によるセファゾリン(A)及び PSP 輸送(B)  
\*P<0.05, †P<0.05

び hOAT3 によるアニオン性基質の取り込みを濃度依存的に阻害した。また、セファゾリンは hOAT3 に輸送されるものの、hOAT1 による輸送は観察できなかった (Fig 3A)。一方、PSP はともに hOAT1 と hOAT3 によって輸送された (Fig 3B)。

## 2) ヒト腎正常組織における遺伝子発現変動

正常腎組織における薬物トランスポータ群の発現量について検討し、最終的に 80 例の検体について解析した (Fig 4)。正常腎組織での発現量は hOAT3 が最も高く、次いで hOAT1 であった。遺伝子ファミリー間を比較しても有機アニオントランスポータ群の発現量が他の遺伝子ファミリーと比較して高い傾向を示している。有機カチオントランスポータ群

では hOCT2 が最も高く、hOCT3 と hOCT2-A の発現量はほぼ同程度であった。hOCT1 の発現量は今回定量を行った中で最も低値を示しており、カチオン性薬物の腎排泄における寄与は少ないと考えられる。

## 3) 腎疾患時における薬物トランスポータの発現変動

本年度も継続して、病理診断を目的として腎生検が施行された患者の余剰組織検体を用いて薬物トランスポータ mRNA 発現量を検討した。最終的に 42 症例について解析した。その結果、腎近位尿細管側底膜に発現する hOAT1 の発現量が正常腎皮質と比較して有意に低下していることが明らかとなった

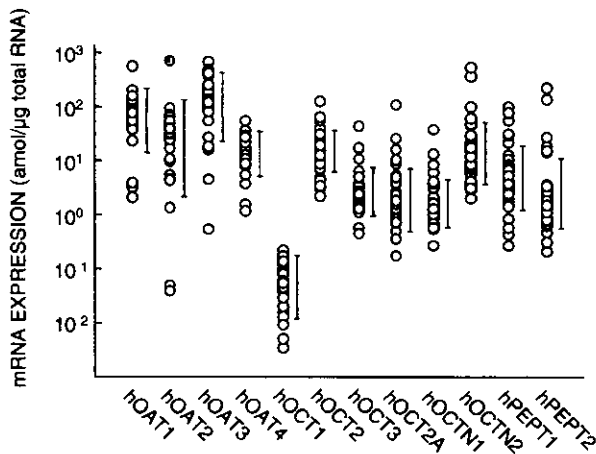


Fig 4 正常腎組織における薬物トランスポータ群の遺伝子発現量

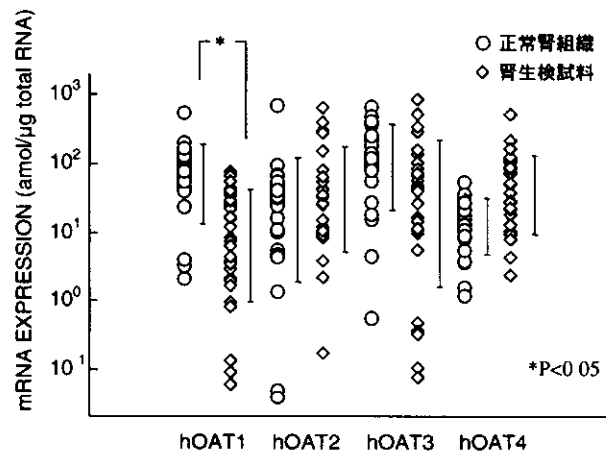


Fig 5 腎機能低下患者における有機イオントランスポータファミリー (SLC22A) mRNA の発現比較

(Fig 5)。また hOAT3 や hOCT2 発現量も低下傾向を示す一方、hOAT2 や hOAT4 の発現量は上昇傾向を示しており、各薬物トランスポータが腎疾患時において異なった発現変動を示すと考えられる。本研究では同様の疾患が疑われる患者数が少なく系統立てた解析による疾患ごとの分類までは困難であったが、今後引き続き研究を継続し各腎疾患時の薬物トランスポータ発現変動プロファイル構築を目指したいと考える。

#### 4) 腎疾患患者における薬物体内動態の変動

前述の「腎疾患時における薬物トランスポータの発現変動」において薬物トランスポータ遺伝子発現量を検討した患者群で、腎生検施行後、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体内動態について検討した。1時間の定速静注直後と1時間後に採血を行い、血中濃度を測定した。得られた血中濃度推移から体内消失速度を算出した。セファゾリンはほぼすべてが未変化体として尿中に排泄されるため、その消失速度は腎臓による排出能変動を反映していると考えられる。また、クレアチニンクリアランスより糸球体濾過速度を、体重より分布容積を算出し、腎分泌クリアランスも併せて算出した。その結果、セファゾリンの排泄は、糸球体濾過速度の指標として用いられているクレアチニンクリアランスよりも、PSP 検査値とより高い相関を示すことが明らかとなった。これらの結果は、糸球体濾過速度の変動と尿細管分泌能との変動が同様ではないことを示唆している。また、PSP は腎アニオ

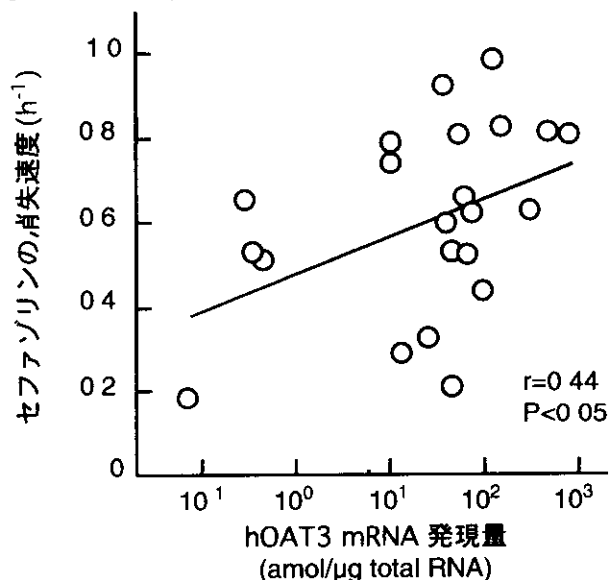


Fig 6 セファゾリンの消失速度と hOAT3 遺伝子発現量との相関

ン輸送系によって尿細管分泌を受けることか明らかとされており、セファゾリンと PSP が同様のトランスポータによって輸送されると考えられた。

さらにセファゾリンの排泄量とトランスポータ発現量とを比較解析した。その結果セファゾリンの消失速度と hOAT3 mRNA の発現量との間に有意な相関が認められた (Fig 6)。また、腎分泌クリアランスとも有意な相関を示していることから、セファゾリンの尿細管分泌速度が薬物トランスポータ発現量によって変動し、セファゾリン腎排泄が変化すると考えられた。

#### 5) ヒト型トランスポータの遺伝子多型解析

正常腎組織において薬物トランスポータの発現量に個体差が認められており、この要因としてヒト有機カチオントランスポータの遺伝子多型を想定して解析をおこなった。hOCT1 及び hOCT2 は共に SLC22A ファミリーに属しており、第六染色体上にコードされている。本研究では 58 種の遺伝子多型について解析を行ったが、遺伝子多型と発現量との間に有意な相関は認められていない。また、多剤耐性遺伝子 MDR1 の多型についても検討したが、各遺伝子多型群で mRNA 発現量に有意な差は認められなかった。

#### D 考察

近年、薬物療法の多様化にともなって薬剤性腎障害の発症頻度が高くなっており、臨床上問題となっている。腎臓は薬物排泄の主要な臓器であり、また腎機能障害時における薬物投与设计は、腎機能の悪化を含む二次的な副作用発現を防ぐために非常に重要である。腎機能低下は、有効ネフロン数の減少に起因するため糸球体濾過速度と同様に変動すると考えられている。従って、糸球体濾過速度を良好に反映するクレアチニンクリアランスなどの腎機能検査値をもとに、薬剤の投与量が調節されてきた。しかし、本研究ではクレアチニンクリアランスが正常値よりやや低い患者群で、セファゾリンの体内消失速度とクレアチニンクリアランスとの相関が低くなることを見出した。このことは腎機能低下か進行している患者では、糸球体の限外濾過機能の低下と尿細管分泌機能の低下とが必ずしも対応しないことを示唆している。また PSP 試験値とセファゾリン排泄速度が高い相関を示すことから、糸球体濾過速度に加え腎尿細管分泌能を評価することで患者個々に応じた精度の高い投与设计が可能になると考えられる。



hOAT3 発現量がセファゾリンの消失速度や見かけの尿細管分泌量と正の相関を示すことから、薬物トランスポート発現量が腎薬物排泄能を規定する因子となりうることが示唆され、トランスポートの機能及び発現変動に関する情報が薬物腎排泄の予測と至適薬剤投与設計法確立に有用な情報を提供すると考えられる。また、セファゾリンの消失速度及び腎排泄が hOAT3 発現量と有意な相関が認められる一方、hOAT1 とセファゾリンの排泄速度との間には有意な相関が認められないこと、腎疾患患者において hOAT1 の発現量が顕著に低下していることなどから、腎機能低下患者において hOAT3 がセファゾリンの主要な尿細管分泌経路になっていると考えられる

本年度は臨床上高齢者において使用頻度の高い薬物を中心に、トランスポートの輸送機能を解析した。これまで、有機アニオントランスポートの基質認識特性は非常に類似しており、体内動態における役割の差別化並びに寄与率の算出は困難であった。本研究においてファミチジンが hOAT3 の選択的阻害剤となることが示されたことは、今後 hOAT1 と hOAT3 の腎薬物排泄における寄与率を検討する上で重要な情報である。またセファゾリンは hOAT1 の輸送を阻害するものの、hOAT1 を介した輸送は認められなかった。これまでの検討では、典型的基質の輸送に対する阻害様式から基質認識特性を論じられることが多かった。しかし、本研究結果は輸送機能阻害による解析結果が必ずしも輸送特性を反映するものではなく、それぞれの薬物に関して輸送そのものを検討する必要性を示している。

以上の研究成果は、副作用回避を目的とした高齢者の至適薬剤投与設計法確立に有用な情報を提供するものである。

## E 結論

尿細管薬物トランスポートの機能特性ならびに発現変動に関する情報は、分子的根拠に基づいた薬物排泄量の予測系確立及び至適投与設計法の確立に有用な情報となる。

## F 健康危険情報

得られた成果の中に健康被害情報に該当するものはない。

## G 研究成果発表

### 1 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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* , 282(4), G617-G623 (2002)
- 4) Shimomura, M , Masuda, S , Saito, H , Sakamoto, S , Uemoto, S , Tanaka, K and Inui, K Roles of the jejunum and ileum in the first-pass effect as absorptive barriers for orally administered tacrolimus *J Surg Res* , 103(2), 215-222 (2002)
- 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 ion transporters in the human kidney *J Am Soc Nephrol* , 13(4), 866-874 (2002)
- 6) Uwai, Y , Saito, H and Inui, K Rat renal organic anion transporter rOAT1 mediates transport of urinary-excreted cephalosporins, but not of biliary-excreted cefoperazone *Drug Metabol Pharmacokin* , 17(2), 125-129 (2002)
- 7) 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* , 19(6), 738-743 (2002)
- 8) Ji, L , Masuda, S , Saito, H and Inui, K Down-regulation of rat organic cation transporter rOCT2 by 5/6 nephrectomy *Kidney Int* , 16(2), 514-524 (2002)
- 9) Fukada, A , Saito, H and Inui, K Transport mechanisms of nicotine across the human intestinal epithelial cell line Caco-2 *J Pharmacol Exp Ther* , 302(2), 532-538 (2002)

- 10) Goto, M , Masuda, S , Saito, H , Uemoto, S , Kiuchi, T , Tanaka, K and Inui, K C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation *Pharmacogenetics*, 12(6), 451-457 (2002)
- 11) Urakami, Y , Akazawa, M , Saito, H , Okuda, M and Inui, K cDNA cloning, functional characterization, and tissue distribution of an alternatively spliced variant of organic cation transporter hOCT2 predominantly expressed in the human kidney *J Am Soc Nephrol* , 13(7), 1703-1710 (2002)
- 12) Shiki, T , Hashimoto, Y and Inui, K Simulation for population pharmacodynamic analysis of dose-ranging trials usefulness of the mixture model analysis for detecting nonresponders *Pharm Res* , 19(6), 909-913 (2002)
- 13) Yamashita, T , Konishi, M , Miyake, A , Inui, K and Itoh, N Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway *J Biol Chem* , 277(31), 28265-28270 (2002)
- 14) Pan, X , Terada, T , Irie, M , Saito, H and Inui, K Diurnal rhythm of H<sup>+</sup>-peptide cotransporter in rat small intestine *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* , 283(1), G57-G64 (2002)
- 15) Jiko, M , Yano, I , Wakasugi, H , Saito, H and Inui, K Evaluation of pharmacokinetic interaction between cyclosporin A and probucol in rats *Pharm Res* , 19(9), 1362-1367 (2002)
- 16) Habu, Y , Yano, I , Hashimoto, Y , Saito, H and Inui, K p-Aminohippurate transport at the apical membrane in the OK kidney epithelial cell line *Pharm Res* , 19(12), 1822-1826 (2002)
- 17) Ohnishi, S , Saito, H , Fukada, A and Inui, K Distinct transport activity tetraethylammonium from L-carnitine in rat renal brush-border membranes *Biochim Biophys Acta*, 1609(2), 218-224 (2003)
- 18) Horiba, N , Masuda, S , Takeuchi, A , Takeuchi, D , Okuda, M , and Inui, K Cloning and characterization of a novel Na<sup>+</sup> dependent glucose transporter NaGLT1 in rat kidney *J Biol Chem* , (2003) in press
- 19) 齋藤秀之、乾 賢一 腎疾患時における薬物投与計画 *臨床薬理*, 33(2), 25-36 (2002)
- 20) 奥田真弘、乾 賢一 高齢者の薬物動態特性と服薬管理 *日本醫事新報*, 4097, 16-22 (2002)
- 2 学会発表
- 1) 増田智先、乾 賢一 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-糖蛋白質発現 *日本薬学会 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分子～薬物の消化管吸収との関連性～」* (2002 年 3 月、千葉)
- 2) Inui, K , Rational dosage regimen of tacrolimus and genetic information in organ transplantation *The 1<sup>st</sup> Korea-Japan Joint Symposium on Drug Delivery and Therapy Podium Session III (April 2002, Korea)*
- 3) Inui, K , Physiological and pathophysiological roles of organic ion transporters in the kidney *14<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations Parallel Session 11 Transporters (July 2002, Sapporo)*
- 4) Inui, K , Terada, T , Basolateral peptide transporters in intestinal and renal epithelial *International Meeting “TRANSPORTER2002 ” Session VII Peptide transporter (September 2002, Germany)*
- 5) 浦上裕美子 薬物腎移行に関わる有機カチオントランスポータ(OCT)の分子的多様性 支部奨励賞受賞者講演 第 5 2 回日本薬学会近畿支部総会 大会 (2002 年 10 月、大阪)
- 6) 乾 賢一 トランスポータ研究の薬物動態解析への応用と臨床展開 第 17 回日本薬物動態学会年会 学会賞受賞講演 (2002 年 11 月、東京)
- 7) 齋藤秀之、増田智先、本橋秀之、浦上裕美子、上井優一、桂 敏也、奥田真弘、乾 賢一 腎尿細管薬物トランスポータの構造 機能解析と臨床的意義 第 17 回日本薬物動態学会年会 シンポジウム 主題 2 創薬パラダイムシフト下における Pharmacokinetics, transporter, drug delivery 研究 (2002 年 11 月、東京)
- 8) Saito, H , Molecular aspect and physiological

implications of organic ion transporters  
Molecular Biopharmaceutics A new era in drug  
absorption transport and delivery Session II  
Molecular Advance in Metabolism and  
Transport (January 2003, U S A )

#### H 知的財産権の出願 登録状況

##### 1 特許取得

- 1) ヒト腎臓に発現する有機カチオントランスポ  
ータ hOCT2-A とその遺伝子 (特願 2002-  
58088)

平成14年3月4日出願

- 2) グルコーストランスポータ NaGLT1 及びその  
遺伝子 (特願 2002-363014)

平成14年12月13日出願

##### 2 実用新案登録

特になし

##### 3 その他

特になし

# 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】

腎機能低下患者における薬物排泄機能と薬物トランスポータ発現量との相関解析を行い、投与設計における薬物トランスポータ発現量情報の有用性と臨床的意義について検討する。腎機能低下患者において、hOAT1 遺伝子の発現量が低下していることを見出され、また hOAT3 及び hOCT2 などにも減少傾向が認められた。一方、hOAT2 及び hOAT4 などでは上昇傾向が認められた。従って、腎疾患時において各トランスポータが異なった発現変動を示すことが示唆された。一方、hOAT3 発現量と抗生剤セファゾリンの腎排泄との間に有意な正の相関が認められ、hOAT3 発現量がセファゾリンの腎排泄を規定する一要因となる可能性が考えられた。これらの研究成果は、トランスポータ発現量を考慮した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。

### A 研究目的

腎機能障害が認められる患者の薬物体内動とトランスポータ発現量との関連について明らかにするため、腎生検試料を用いて薬物トランスポータ発現量を定量するとともに、薬物体内動態との相関解析を行う。

### B 研究方法

組織学的診断のため採取された腎生検試料の余剰サンプルを用い、各薬物トランスポータ群の発現量をリアルタイム PCR 法で測定した。また、腎生検が施行された患者における抗生物質セファゾリンの体内動態を解析し、腎機能検査値並びに薬物トランスポータ発現量との相関について検討した。本研究は主任研究者との共同で行っており、成果の一部は総括研究報告書において記述している。

#### （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。遺伝カウンセリングは原則として行わないか、対象患者個人の「知る権利」及び「知らない権利」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」という題目で徳島大学医学部附属病院病院倫理小委員会より平成12年8月29日付けて承認を受けた。

### C 研究成果

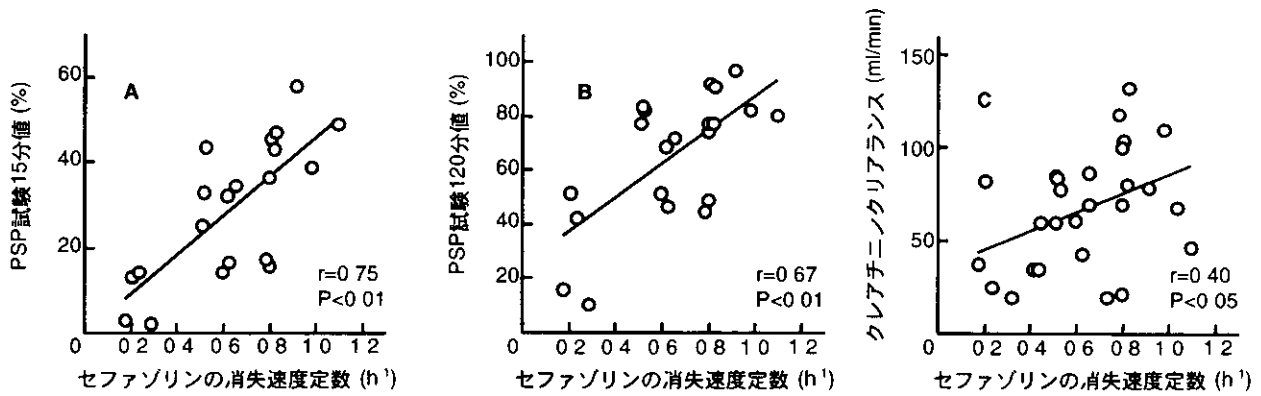


Fig 1 セファゾリンの消失速度と腎機能検査値との相関

### 1) 腎疾患患者における薬物トランスポータの発現変動

昨年度に引き続き、腎機能低下により各種腎疾患が疑われ、病理診断目的で腎生検が施行された患者の余剰組織検体を用いて薬物トランスポータmRNA発現量を検討した。最終的に42症例について解析を行った。腎近位尿細管側底膜に発現するhOAT1の発現量が、正常腎皮質と比較して有意に低下していることが明らかとなった。またhOAT3やhOCT2の発現量も低下傾向を、hOAT2やhOAT4の発現量は上昇傾向を示しており、腎疾患時において薬物トランスポータが異なった発現挙動を示すと考えられた。またカチオン性薬物を輸送するhOCT2の発現量は低下傾向を示しており、腎疾患時におけるカチオン性薬物の排出低下にも関係すると考えられた。

### 2) 腎疾患患者における薬物体内動態の変動

腎生検施行後、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体内動態について検討した。定速静注直後と投与1時間後に採血を行い血中濃度を測定し体内消失速度を算出した。セファゾリンはほぼすべてが未変化体として尿中に排泄されるため、体内消失速度は腎臓からの排出変動を反映していると考えられる。また、クレアチニンクリアランスより糸球体濾過速度を、体重より分布容積を算出し、腎分泌クリアランスも併せて算出した。セファゾリンの排泄速度と腎機能検査値との比較解析を行ったところ、クレアチニンクリアランスよりもPSP検査値と高い相関を示すことが明らかとなった (Fig 1)。これらの結果は、糸球体濾過速度の変動と尿細管分泌能との変動が同等ではなく、薬物排泄能の予測には糸球体濾過速度に加え尿細管分泌能を考慮する必要性を示唆している。

さらに、腎疾患患者におけるセファゾリンの消失速度とトランスポータ発現量との比較解析を行った。その結果 セファゾリン消失速度並びに腎分泌量と

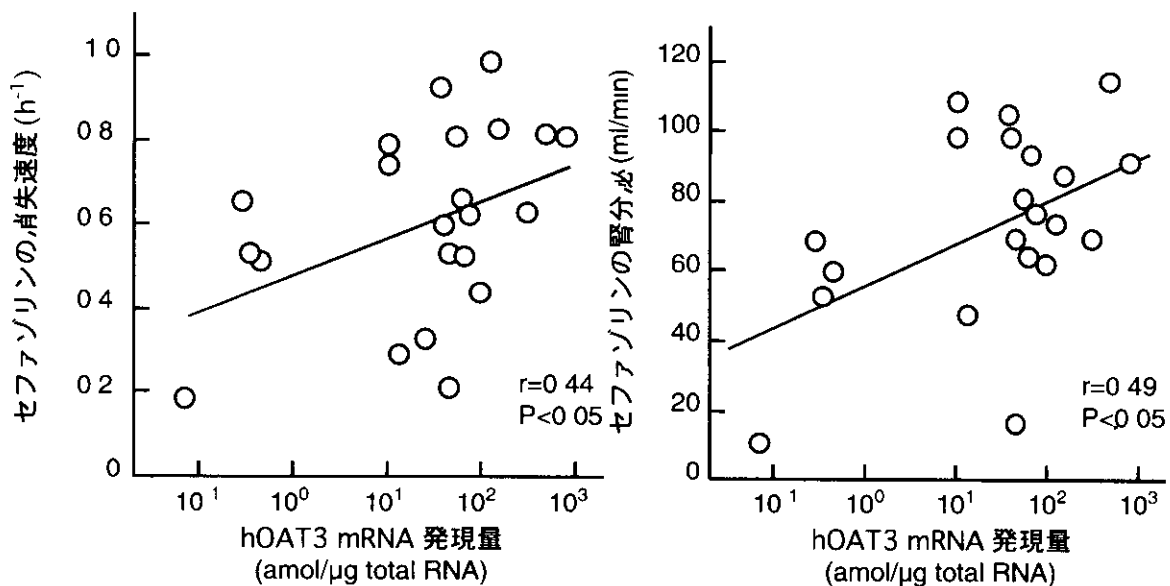


Fig 2 hOAT3 mRNA 発現量とセファゾリンの腎分泌及び消失速度との相関

hOAT3 の発現量との間に有意な相関が認められた (Fig 2)。しかしながら hOAT1、hOAT 2 及び hOAT4 など、他の有機イオントランスポータ発現量との間には相関が認められなかった。

#### D 考察

本研究では、正常部において高い発現の認められた有機イオントランスポータ群について、腎疾患時における発現量を測定した。その結果、腎疾患時において、各薬物トランスポータが異なった発現変動を示すことが示唆された。このことから、個々の薬物が何れのトランスポータによって尿細管分泌されているかによって、疾患時における体内動態が異なる可能性が考えられる。検討を行った腎疾患は IgA 腎症をはじめとして各種腎疾患を呈する患者群であり、今後疾患ことの発現変動についてさらに詳細な解析が必要であると考えられる。また、腎薬物トランスポータ発現量と薬物排泄能との相関をヒトにおいて見出した。hOAT3 発現量がセファゾリンの体内消失速度並びに腎分泌量とより高い相関を示していることから、セファゾリンの尿細管分泌が hOAT3 発現量に伴って変動し、体内消失速度を変動させると予測された。これらは腎薬物トランスポータ群の発現変動が薬物体内動態に影響を及ぼすことを示唆しており、トランスポータ発現量に関する情報を基盤として、薬物の体内動態予測系を構築しえることが示唆された。以上の研究成果は、至適薬剤投与設計へ有用な情報を提供するものであると考えられる。

#### 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) Yanagita, M, Ishimoto, Y, Arai, H, Nagai, K, Ito, T, Nakano, T, Salant, DJ, Fukatsu, A, Doi, T, Kita, T Essential role of Gas6 for glomerular injury in nephrotoxic nephritis *J Clin Invest*, 110(2) 239-246, (2002)

2) Sano, H, Ueda, Y, Takakura, N, Takemura, G, Doi, T, Kataoka, H, Murayama, T, Xu, Y, Sudo, T, Nishikawa, S, Nishikawa, S, Fujiwara, H, Kita, T, Yokode, M, Blockade of platelet-derived growth factor receptor-beta pathway induces apoptosis of vascular endothelial cells and disrupts glomerular capillary formation in neonatal mice *Am J Pathol* 161(1) 135-43,

(2002)

3) Hirata, M, Makibayashi, K, Katsumata, K, Kusano, K, Watanabe, T, Fukushima, N, Doi, T 22-Oxalacitriol prevents progressive glomerulosclerosis without adversely affecting calcium and phosphorus metabolism in subtotal nephrectomized rats *Nephrol Dial Transplant*, 17(12) 2132-2137, (2002)

4) Nagai, K, Arai, H, Yanagita, M, Matsubara, T, Kanamori, H, Nakano, T, Iehara, N, Fukatsu, A, Kita, T, Doi, T Growth arrest-specific gene 6 is involved in glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy *J Biol Chem*, in press

#### 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】

ヒト正常腎および病腎におけるトランスポータ群のうち hOAT1 及び hOAT3 タンパク質発現を免疫組織化学的に検討し、病変との関係を考察した。hOAT1、hOAT3 は共に近位尿細管側底膜側に局在を認め、hOAT1 の方が広範に分布し、hOAT3 はより限局した尿細管のセグメントに発現が認められた。腎疾患および腎機能とトランスポータタンパク質発現変動との相関について解析したものの、各患者での差が大きく、疾患ごとに特徴的な発現変動は確認できなかった。

### A 研究目的

腎機能障害を有する患者の薬物療法時には、薬剤選択と投与方法に留意する必要がある。これまで主任研究者らによって、ヒト正常腎及び腎疾患時における薬物トランスポータ群の発現について研究が進められてきた。遺伝子発現変動に加えて、各種腎疾患における薬物トランスポータタンパク質群の発現変動を明らかにすることによって、腎疾患時における薬物動態の変化をさらに詳細に推測することが可能となり、腎障害の発症の予防に貢献できると考える。

### B 研究方法

本年度は新たに有機アニオントランスポータ hOAT4 部分配列ペプチドを家兔に免疫し、特異的抗体を作製した。シグナルの特異性は抗原ペプチドを用いた吸収試験により確認した。腎疾患か疑われ、組織学的診断のため採取される腎生検試料の余剰サンプルを採取し、特異的抗体を用いて各種薬物トランスポータタンパク質の発現について検討した。

（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し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。遺伝カウンセリングは原則として行わないか、対象患者個人の「知る権利」及び「知らない権利」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。さらに平成13年3月29日の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、実施期間を遡って再度承認申請し、平成14年11月20日付けて承認書が交付されている。

### C 研究成果

10%緩衝ホルマリン固定パラフィン抱埋切片に

においては、酸 アルカリを含む各種処理後においても、免疫組織学的には局在を同定することはできなかった。これらの過程において、トランスポータの抗原性が失活すると考えられた。次に凍結切片を用いて、蛍光抗体法によりトランスポータタンパク質の局在について検討したところ、シグナルの観察が可能であった。また 抗原ペプチドを用いた吸収操作によって陽性シグナルが消失したことから、その特異性を確認してきた。hOAT1 と hOAT3 は尿細管側底膜側に発現が認められ、とくに hOAT1 は近位尿細管の限局した部位に強い発現が認められた。一方、hOAT4 は尿細管上皮細胞の刷子縁膜に発現が認められた。

微小変化型ネフローゼ症候群の患者では、hOAT1 及び hOAT3 の発現程度（局在の分布）に正常腎組織と比較して差は認められるもの（Fig 1）、症例ごとの差が大きいため病変の程度と発現変動との相関については判定が困難であった。また膜性腎症や IgA 腎症においても hOAT1 及び hOAT3 の発現に大きな個体差が認められた。顕微鏡標本にて強い尿細管障害が認められる症例では hOAT3 タンパク質の発現が認められない場合があった。

#### D 考察

ヒト腎においては hOAT1、hOAT3 タンパク質の発現が組織化学的に認められ、hOAT1 か hOAT3 と比較してより広範に局在することが判明した。凍結切片を用いた免疫組織染色では、トランスポータタンパク質の発現が認められる部位における病変観察が困難であり、直接的な比較が不可能であった。また隣接する組織標本の顕微鏡所見と比較したものの、局所的な組織変化が大きいため、トランスポータタンパク質発現変動と組織変化との間に相関を認めるには至らなかった。トランスポータ遺伝子発現変動解析において、hOAT1 mRNA が腎疾患時に顕著に低下することを示している。しかしながら、遺伝子発現量にも個体差が認められており、患者ごとに発現のばらつきが認められた免疫組織学的検討と相関すると考えられる。今後、検討を重ねることで、各疾患及び組織学的変化とトランスポータタンパク質発現変動との相関が明らかにされると期待する。また hOAT3 遺伝子発現量も減少傾向が認められており、尿細管障害が強いと考えられる部位において hOAT3 の発現が認められなかったことと対応するものと考ええる。



Fig 1 微小変化群ネフローゼ症候群における hOAT1 タンパク質の発現

#### E 結論

薬物トランスポータ遺伝子発現量の変動に加え、トランスポータタンパク質の発現並びに局在の変動を明らかにすることは、腎疾患時における薬物トランスポータ群の発現変動と薬物腎排泄との関連を解明する上で重要な情報である。

#### F 健康危険情報

現時点では特になし

#### G 研究発表

- 1) Kozaki K, Kasahara M, Oike F, Ogawa K, Fujimoto Y, Ogura Y, Ueda M, Kaihara S, Fukatsu A, Tanaka K Apheresis therapy for living-donor liver transplantation *Ther Apher* 6(6) 478-83 (2002)
- 2) Katayama M, Wada T, Nagai K, Takechi H, Wakatsuki Y, Kita T, Fukatsu A, Yamada Y POEMS syndrome with increased vascular endothelial growth factor (VEGF) and multiple osteosclerotic lesion *Nippon Naika Gakkai Zasshi* 91(6) 1864-1866 (2002)
- 3) Yanagita M, Ishimoto Y, Arai H, Nagai K, Ito T, Nakano T, Salant DJ, Fukatsu A, Doi T, Kita T Essential role of Gas6 for glomerular injury in nephrotoxic nephritis *J Clin Invest* 110(2) 239-46 (2002)
- 4) Yamada H, Adachi T, Fukatsu A, Misao S, Yamada Y, Aoki T, Miura N, Sakuma M, Nishikawa K, Futema A, Kakumu S Extracellular superoxide dismutase and glomerular mesangial cells its production and



regulation FEBS Lett 519(1-3) 77-81 (2002)

H 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

特になし

2 実用新案登録

特になし

3 その他

特になし

# 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】

一般に腎癌は抗癌剤に対して感受性が低いことが知られており、外科的手技によって摘出が困難である場合は免疫療法が選択される。しかし免疫療法の効果も、20-40%程度である。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）は細胞内から細胞外へ種々薬物を汲み出す働きを有しており、各種細胞癌において抗癌剤耐性の原因遺伝子として想定されている。腎細胞癌についても MDR1 や MRP2 などに関する報告はあるものの、抗癌剤耐性との関連は不明である。本研究では、根治的摘除術が施行された腎腫瘍患者の正常及び腫瘍組織における ABC 遺伝子スーパーファミリーの発現量について検討した。腎腫瘍患者では MDR1 及び MRP1-6 の発現が認められ、MRP 1 及び MRP3 が高い発現量を示した。正常部と比較したところ MRP3 の発現量が腫瘍組織において高く、MRP 1 は正常部とほぼ同程度の発現量であった。一方、近年 MDR1 遺伝子 3435 位が T/T 型変異の発現頻度が腎腫瘍患者において健康人よりも高いとの報告がなされた。本研究においても MDR1 遺伝子多型の発現頻度について検討したが、健康人とほぼ同程度であり、日本人では MDR1 遺伝子多型は腎腫瘍の危険因子とならないと考えられた。これらの成果は、腎腫瘍の化学療法耐性機序の解明に有用な情報を提供するものとする。

### 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、そのひとつの要因として抗癌剤の細胞外への排出を促進する 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な点が多く、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相関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プングならびに、腎腫瘍発症予測因子としての MDR 1 遺伝子多型について解析する。

### 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、正常及び腫瘍組織よりゲノム DNA を精製し、PCR-RFLP 法により遺伝子多型解析を行った。

（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。

### C 研究成果

#### 腎腫瘍組織における薬物トランスポータの発現定量

本年度は、解析症例数が 27 症例となり正常及び腎腫瘍組織部での ATP 駆動型薬物トランスポータ発現量プロファイルを同定した (Fig 1)。正常腎

組織においては、MDR1 の発現量が最も高く次いで MRP1 であった。一方、正常腎組織における MRP3 の発現量は今回測定を行った7種類の ATP 駆動型有機イオントランスポータ群中、2番目に低い発現量であったか、腎腫瘍組織では正常組織と比較して顕著に高く、MRP1 について2番目の発現量であった。今回検討を行った腎腫瘍において ABC トランスポータ発現量は症例ごとに個人差が認められており、腎腫瘍の抗癌剤耐性を複雑にする一因である可能性も考えられる。一方、特異抗体を用いた免疫組織染色の結果、MDR1、MRP1、MRP2 及び MRP3 タンパク質は腫瘍細胞の細胞膜に発現が認められた。

次に、正常腎皮質部並びに腫瘍組織部からゲノム DNA を精製し、MDR1 遺伝子多型について解析を行った。今回、正常組織と腎腫瘍組織で MDR1 遺伝子多型に差は認められなかった。この点に関してはさらに詳細な解析が必要であるが、腫瘍化に伴う遺伝子変異は生していないと考えられる。また腎腫瘍患者における各 MDR1 遺伝子多型の発現頻度は、以前解析を行った肝移植患者群と比較して差が認められなかった。これらの結果は、MDR 多型が腎腫瘍の危険因子となるとの Siegsmond らの報告と矛盾するものであり、日本人における MDR1 遺伝子多型と腎腫瘍発現頻度との相関については議論の余地があると考えられる。

#### D 考察

本研究で ATP 駆動型有機イオントランスポータの発現変動並びに遺伝子多型について解析を行った。MDR1 遺伝子にコードされている P 糖蛋白質は多剤耐性を示す腫瘍組織より同定され ATP 加水分解エネルギーを駆動力として、細胞内の種々薬物を細胞外に汲み出す働きを有している。このことから腫瘍組織の多剤耐性化の原因遺伝子として考えられてきた。一方、MRP1 は MDR1 が発現していない抗癌剤耐性細胞から単離され、P 糖蛋白質と同様に抗癌剤耐性の原因遺伝子とされている。さらに MRP2 及び MRP3 も細胞内の抗癌剤を汲み出す働きを有している。本研究において、ほぼすべての細胞においてこれらのトランスポータ発現が認められたことから、腎腫瘍の抗癌剤耐性は、数種の薬物トランスポータが協調することで複雑になっている可能性が考えられた。

一方、本研究では腎腫瘍患者での MDR1 遺伝子多型の頻度と以前検討が行われた肝移植患者群との

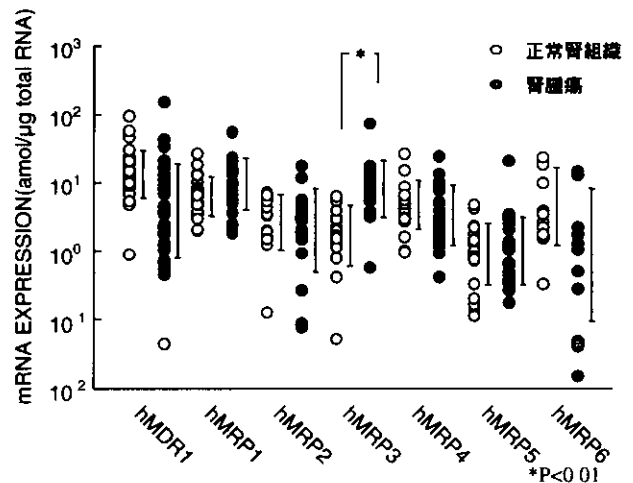


Fig 1 正常及び腎腫瘍組織における ATP 駆動型薬物トランスポータの遺伝子発現

間に差が認められなかった。最近、MDR1 遺伝子の 3435 位が T/T 型である頻度か、腎腫瘍患者では健常人と比較して有意に高いことが報告されており、この遺伝子多型が腎腫瘍発現の危険因子となることが提唱された。しかしながら本研究において、3435 位が T/T 型である患者の頻度は約 25%と健常人と同程度であった。これらの結果は MDR1 の 3435 位における遺伝子多型が日本人では予測因子とならないことを示唆している。また、MDR1 遺伝子の他の多型頻度についても同様に検討したが、腎腫瘍患者に特徴的な発現頻度の変化は認められていない。

以上、本研究成果は腎腫瘍の抗癌剤耐性機序の解明に有用な基礎的情報を提供し、現在有効性が検討されている免疫療法との多剤併用療法における薬剤選択や奏効率向上に有用な基礎的知見となると考える。

#### E 結論

腎腫瘍組織において ATP 駆動型有機イオントランスポータが発現していること、また MRP3 の発現量が正常部と比較して顕著に高いことが明らかとなった。さらに、日本人において MDR1 遺伝子の 3435 位の遺伝子多型は腎腫瘍の危険因子とはならないことが示唆された。本研究は腎腫瘍の抗癌剤耐性機序を解明するための有用な基礎的知見と考える。

#### F 健康危険情報

現時点では特にならない。

## G 研究発表

### 1 論文発表

- 1) Ueda T, Tamaki M, Ogawa O, Yoshimura N Overexpression of platelet-derived endothelial cell growth factors/thymidine phosphorylase in patients with interstitial cystitis and bladder carcinoma *J Urol*, 167 347-345, 2002
- 2) Wu X-X, Kakehi Y, Mizutani Y, Kamoto T, Kinoshita H, Isogawa Y, Terachi T, Ogawa O Doxorubicin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer *Int J Cancer*, 20 949-954, 2002
- 3) Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, Urakami Y, Goto M, Fukatsu A, Ogawa O, Inui K Gene expression levels and immunolocalization of organic iron transporters in the human kidney *J Am Soc Nephrol*, 13 866-874, 2002
- 4) Aoyama T, Hosseinkhani H, Yamamoto S, Ogawa O, Tabata Y Enhanced expression of plasmid DNA-cationized gelatin complex by ultrasound in murine muscle *J Cont Release*, 80 345-356 2002
- 5) Nakamura E, Megumi Y, Kobayashi T, Kamoto T, Ishitoya S, Terachi T, Tachibana M, Matsushiro H, Habuchi T, Kakehi Y, Ogawa O Genetic polymorphisms of the Interleukin-4 receptor a gene are associated with an increasing risk and poor prognosis of sporadic renal cell carcinoma in a Japanese Population *Clin Cancer Res*, 8 2620-2625, 2002
- 6) Kakehi Y, Kamoto T, Ogawa O, Arai Y, Litwin M S, Suzukamo Y, Fukuhara S Development of Japanese version of the USLA Prostate Cancer Index a pilot validation study *Int J Clin Oncol*, 7 306-311, 2002
- 7) Fujiwara H, Emi M, Nagai H, Nishimura T, Konishi N, Kubota Y, Ichikawa T, Takahashi S, Shuin T, Habuchi T, Ogawa O, Inoue K, Skolnick M H, Swensen J, Camp N J, Tavtigian S V Association of common missense changes in ELAC2 (HPC2) with prostate cancer in a Japanese case-control series *J Hum Genet*, 47 641-648, 2002
- 8) Kamoto T, Satomura S, Yoshiki T, Okada Y, Henmi Y, Nishiyama H, Kobayashi T, Terai A, Habuchi T, Ogawa O Lectin-reactive a-fetoprotein (AFP-L3%)curability and prediction of clinical course after treatment of non-seminomatous germ cell tumors *Jpn J Clin Oncol*, 32 472-476, 2002
- 9) Hosseinkhani H, Aoyama T, Ogawa O, Tabata Y Liver targeting of plasmid DNA by pullulan conjugation

based on metal coordination *J Cont Release*, 83 287-302, 2002

- 10) Okada T, Sonoda E, Yamashita Y M, Koyoshi S, Tateishi S, Yamaizumi M, Takeda M, Ogawa O, Takeda S Involvement of vertebrate Polk in Rad18-independent postreplication repair of UV damage *J Biol Chem*, 277 48690-48695, 2002
- 11) Yoshimura K, Arai Y, Fujimoto H, Nishiyama H, Ogura K, Okino T, Ogawa O Prognostic impact of extensive parenchymal invasion pattern in pT3 renal pelvic transitional cell carcinoma *Cancer* 94 3150-3156, 2002
- 12) Hosseinkhani H, Aoyama T, Yamamoto S, Ogawa O, Tabata T In vitro transfection of plasmid DNA by amine derivatives of gelatin accompanied with ultrasound irradiation *Pharmaceut Res*, 19 1471-1479, 2002
- 13) Abe A, Sato K, Habuchi T, Wang L, Li Z, Tsuchiya N, Ohyama C, Satoh S, Ogawa O, Kato T Single nucleotide polymorphisms in the 3' untranslated region of vascular endothelial growth factor gene in Japanese population with or without renal cell carcinoma *Tohoku J Exp Med*, 198 181-190, 2002

## H 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得  
特になし
- 2 実用新案登録  
特になし
- 3 その他  
特になし