

厚生労働科学科学研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

薬物トランスポーターの分子多様性と機能解析
および副作用発現との連鎖解析に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉山 雄一

平成15（2003）年3月

目 次

I. 総括研究報告書

薬物トランスポーターの分子多様性と機能解析および副作用発現との連鎖解析	1
-------------------------------------	---

杉山雄一

II. 分担研究報告

1. 副作用発現の原因となるトランスポーターの <i>in vitro</i> 実験系による同定および <i>in vitro</i> 臨床データ解析	6
---	---

杉山雄一

2. 副作用発現の原因となるトランスポーターに関する臨床研究	9
--------------------------------	---

家入一郎

3. 悪性腫瘍に対する樹状細胞療法の効果と副作用の検討	11
-----------------------------	----

山下直秀

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷り	16
------------------	----

厚生科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総括研究報告書

薬物トランスポーターの分子多様性と機能解析および副作用発現との連鎖解析

主任研究者 杉山 雄一 東京大学・大学院薬学系研究科 教授

研究要旨 薬物の副作用発現メカニズムに関与するトランスポーターの役割を調べる目的で、2つの臨床事例について解析した。cerivastatin について cyclosporin A 併用時に血中濃度の上昇、横紋筋融解症の発現が臨床で見られているが、そのメカニズムが、肝取り込みトランスポーターOATP2 を介した薬物相互作用であることを立証するために、ヒト凍結肝細胞および OATP2 遺伝子発現細胞を用いた定量的解析を行い、代謝阻害よりはむしろトランスポーターが作用点であると考えようほうがより妥当であるという結果を得た。また、後者は、biguanide 化合物の副作用である乳酸アシドーシスの発現を決める要因として、Oct1(-/-) ノックアウトマウスを用いた検討などから、Oct1 による肝取り込み能力の大きさが重要であることを示唆する結果を得た。3種類の有機アニオントランスポーターOATP-C(OATP2), OAT3, MRP2 の遺伝子多型とプラバスタチンの体内動態との関連を遺伝子型で層別化した日本人健康成人23名を対象として評価した。遺伝子解析の結果から、OATP-C, OAT3, MRP2 に関してそれぞれ数種の変異を同定し、特に薬物動態との関連では、OATP-C の多型で V174A と P336R 保有群について、有意な腎外クリアランスの低下と、AUC の上昇が見られていることから、両変異を持つ患者では、OATP-C を基質とする薬物の血中濃度上昇に伴う副作用に注意する必要があることを示す結果を得た。がん細胞においては MRP 類や BCRP など多剤耐性トランスポーターの発現などが治療上問題となるが、それらの発現も含め重篤化したがんを克服するための戦略として、腫瘍溶解液を用いて、癌抗原を樹状細胞に提示させ、抗腫瘍免疫反応を誘導させる戦略で臨床試験をおこない、10例中3例において腫瘍に対する反応が認められた。

家入 一郎（鳥取大学・医学部附属病院薬剤部、助教授）
山下 直秀（東京大学・医科学研究所附属病院、教授）

死的な相互作用を生じさせることが明らかとなっているが、それが、トランスポーターOATP2 を介した肝取り込み過程にあるという仮説を立証する実験を試みた。また後者は、biguanide 系抗糖尿病薬が、時として乳酸アシドーシスといった重篤な副作用を示すが、このメカニズムとして、Oct1 による肝取り込みの程度が副作用を決定するという仮説を立て、in vitro 発現系と Oct1 ノックアウトマウスを用いた in vivo 実験を行った。

2) 副作用発現の原因となるトランスポーターに関する臨床研究

薬物トランスポーターの遺伝子多型と基質薬物の体内動態との関連を評価することでトランスポーターの生体内での機能を明らかにし、副作用や薬効に見られるおおきな個人差の原因を解明し、医薬品開発や適正使用の基盤とすることを目的とし、プラバスタチンが基質となるトランスポーターである、OATP-C(=OATP2), OAT3, MRP2 について遺伝子多型解析と、血中濃度解析との間の相関を観察した。

3) 悪性腫瘍に対する樹状細胞療法の効果と副作用の検討

がん細胞においては MRP 類や BCRP など多剤耐性トランスポーターの発現などが治

A. 研究目的

1) 薬物の副作用発現メカニズムに関与するトランスポーターの役割

薬物の副作用発現の主なメカニズムとして、薬物間相互作用などによる血中濃度の予期せぬ上昇や副作用組織への集積など、薬物動態学的な要因が考えられる。これまでの研究では、主に代謝酵素がその作用点として研究対象とされてきたが、一方で、多くの薬物トランスポーター群のクローニング・機能解析が進み、薬物動態を決定付ける要因の一つとして新たにトランスポーターに焦点が当たりつつある。そこで、臨床において問題となっている相互作用2例をとりあげて、臨床濃度範囲において起こりうる現象であるかまで含め、定量的な解析を in vitro 実験やノックアウト動物を用いた検討をおこなった。cerivastatin が、cyclosporin A との併用により、血中濃度が臨床でも上昇し、横紋筋融解症といった致

療上問題となるが、それらの発現なども含め、重篤化したがんを克服するための戦略として、腫瘍溶解液にて抗原提示させた樹状細胞を体内に導入することで腫瘍免疫治療を重篤なメラノーマに対して試みた。

A. 研究方法

1) 薬物の副作用発現メカニズムに関与するトランスポーターの役割

1. cerivastatin(CER)と cyclosporin A(CsA)の薬物間相互作用メカニズムの解析として CER の ^{14}C 標識体ならびに非標識体を用いて、OATP2 遺伝子発現細胞ならびにヒト凍結肝細胞による取り込み実験および CsA による取り込み阻害実験を試みた。また、代謝阻害の影響を考慮するため、ヒト肝臓ミクロソームを用いた代謝阻害実験も試みた。

2. biguanide 系化合物(metformin を中心に)の乳酸アシドーシス発現における Oct1 の関与を調べるため、biguanide 系化合物(metformin, phenformin, buformin)の輸送を、Oct1 遺伝子発現細胞を用いて検討した。また、Oct1(-)ノックアウトマウスと正常マウスにそれぞれ化合物を投与し、血中濃度推移や全身の薬物分布、また血中乳酸値の変動を確認し、同時にラット遊離肝細胞において化合物の共存下における酸素消費量の変動も合わせて評価した。

2) 副作用発現の原因となるトランスポーターに関する臨床研究

1. 遺伝子解析：OATP-C, OAT3, MRP2, BCRP3 種のトランスポーター遺伝子多型解析を 120 名の健常成人日本人で、翻訳領域を中心に実施した。

2. 臨床試験：OATP-C, OAT3, MRP2 遺伝子型が既知の健常成人ボランティア 23 名を対象とし、共通の基質薬物であるプラバスタチン(PST)を投与し、体内動態との関連を評価した。OATP-C は体内動態パラメーター全般で、OAT3 は腎クリアランスで、MRP2 機能は血中のビリルビン濃度で評価した。

3) 悪性腫瘍に対する樹状細胞療法の効果と副作用の検討

治験審査委員会にて他の治療が無効な第 IV 期メラノーマ症例として認定され、かつ除外基準に該当していないことを確認した患者 10 例の治療を行った。

患者から末梢血単核球を得、フラスコ付着細胞に GM-CSF と IL-4 を添加して 1 週間培養、未熟 DC を作製した。その後腫瘍溶解液を加えさらに TNF- α を添加して 4 日間培養し、成熟 DC とした細胞 (1×10^7 個) を患者皮内に接種した。接

種スケジュールに基づき、IL-2 との併用で行った。その間、腫瘍細胞の評価や遅延型アレルギー反応検査を試み、本治療法の妥当性を評価した。

(倫理面への配慮) 2) については、鳥取大学医学部倫理審査委員会の審査、承認済みであり、臨床試験についても委託医療施設の倫理審査委員会の承認を受けている。3) については、院内の治験審査委員会の承認を受けたプロトコールに従っている。

B. 研究結果

1) 薬物の副作用発現メカニズムに関与するトランスポーターの役割

1. cerivastatin(CER)と cyclosporin A(CsA)の薬物間相互作用メカニズムの解析において、ヒト凍結肝細胞を用いて CER の取り込みに対する CsA の阻害を観察したところ、阻害定数 $K_i=0.28\sim 0.69\mu\text{M}$ とかなり高親和性の阻害を示した。また、OATP2 遺伝子発現細胞においても CsA による阻害の K_i 値は、ヒト凍結肝細胞において見られた K_i 値とほぼ同一の値となった。一方、ヒト肝ミクロソームを用いた代謝阻害実験の結果から、CsA は高濃度域 ($>10\mu\text{M}$) においても CER の代謝を阻害しないことがわかった。

2. biguanide 系化合物(metformin を中心に)の乳酸アシドーシス発現における Oct1 の関与について biguanide 系化合物 3 種(metformin, phenformin, buformin)について Oct1 発現系を用いて取り込み実験を試みた結果、各化合物ともベクター導入細胞と比較して有意な取り込みが観察された。また、metformin に関して、Oct1(-)ノックアウトマウスと、正常マウスに静脈内投与した後の、血漿中濃度推移ならびに臓器分布を検討したところ、肝臓中濃度について、Oct1(-)において、正常マウスの約 30 倍もの顕著に低い分布が見られた。一方、血中乳酸濃度を metformin の i.v. 持続投与下で Oct1(-)と正常マウスで測定したところ上昇は、投与量依存的であり、その程度は、正常マウスの方が有意に高かった。また、ラット遊離肝細胞を用いて、3 種の薬物と濃度を変えて接触させ、そのときの酸素消費量を測定したところ、酸素消費が 75% まで阻害される濃度 IC_{75} と、乳酸値の上昇の EC_{50} との間には順位の相関が見られた。

2) 副作用発現の原因となるトランスポーターに関する臨床研究

OATP-C 遺伝子解析の結果、12 種類の変異を同定し、5 種類がアミノ酸の置換を伴っていた; N130D, N151S, V174A, P336R。また、N130D, V174A は haplotype(*15)であった。

OAT3 遺伝子解析の結果、5 種類の変異を同定し、1 種類がアミノ酸の置換を伴っていた(S789V)。BCRP では 20 種類の変異を同定し、6 種類がアミノ酸置換や stop codon の原因となる。また、臨床試験の結果、被検者に認められた MRP2 変異(V417I, S789F)、OAT3 変異(T723A, S789V)はそれぞれの表現型の指標に影響を及ぼさなかったが、OATP-C 遺伝子多型と PST 体内動態について検討を行った結果、V174A, P336R 保有群では、有意な AUC の上昇、腎外クリアランスの低下が観察された。また、ホモ型変異保有者は少ないが、体内動態の変化には gene dose effect が観察された。

3) 悪性腫瘍に対する樹状細胞療法の効果と副作用の検討

これ以上の治療法が望めない遠隔転移を伴う第IV期悪性黒色腫患者10名がエントリーした。樹状細胞の誘導に関して、すべての患者より安定した数のDCの誘導を行なうことが可能であった。表面マーカーをフローサイトメトリーで解析し、誘導したDCの確認を全症例で行なった(CD14陰性、CD86、HLA-class I、HLA-class II陽性など)。計10回のDC接種を行なうプロトコルであったが、原病の進行が著しく途中で治療を中止した症例が4症例あり、最終的に10症例中SD1名、MR2名、PD7名の結果となった。免疫学的効果の評価について、DTHと治療反応性との相関は認めなかった。CTL活性については、SD、MRの症例でその増加が認められたが、PDの症例でも同様の結果が得られ、解釈は困難であった。追加接種を行なったMRの2症例では経過中、複数ヶ所で炎症反応を伴った腫瘍壊死反応、その後の腫瘍の縮小や消失が認められた。抗核抗体、リウマチ因子などの自己抗体については治療後に陽性となった症例はいなかった。

C. 考察

1) 薬物の副作用発現メカニズムに関与するトランスポーターの役割

cerivastatin(CER)と cyclosporin A(CsA)の薬物間相互作用メカニズムの解析において、CER のヒト凍結肝細胞における取り込みのCsA による阻害の程度(Ki 値)は、OATP2 発現細胞における値とほぼ同等で、CsA の肝臓での最大非結合型濃度も大体同じ値をとることから、実際の臨床においても、OATP2 を介した肝取り込み過程の相互作用がおきることが示唆された。一方で、CER は代謝も受けることから、代謝過程における相互作用の可能性も考えられたが、代謝実験

の結果から、臨床濃度範囲では代謝相互作用は考えにくいという結論に至った。OATP2 は、多くの薬物の取り込みに重要な役割を果たしていることが考えられており、このトランスポーターを介した相互作用が多くの薬物でおこりうることを示唆され、今後いろんな事例がでてくることが推察される。また、biguanide 系化合物の副作用でことを示した。今後、Oct1 により取り込まれる能力が小さく、かつ、肝取り込み過程の Km 値が、ミトコンドリアでの呼吸鎖阻害の IC50 値より小さい値をとるような薬物を創生できれば、より安全な biguanide 系薬物が実現するかもしれない、現在更なる検討を進めている。

2) 副作用発現の原因となるトランスポーターに関する臨床研究

本研究では、OATP-C 遺伝子多型 V174A, P336R が基質薬物の体内動態に大きく関与することが明らかとなった。体内動態への関与は、変異により AUC の有意な上昇であり、腎外クリアランスの低下であると考えられ、変異トランスポーターの機能低下が疑われる。共同研究者による in vitro 発現実験や他の研究者による報告では、V174A 変異による輸送機能の低下が指摘されており、本臨床試験で得られた結果は、in vitro 実験結果と一致している。PST をはじめとするスタチン系薬剤は肝臓が薬効ターゲット臓器であり、また、副作用である横紋筋融解症の発症について、高い血中濃度の維持が危険因子とされていることから、効果の減弱とともに、副作用発現の危険性が示唆される。

3) 悪性腫瘍に対する樹状細胞療法の効果と副作用の検討

悪性黒色腫に関しては、以前から様々なサイトカインを用いるような非特異的免疫を賦活化させる試みなどが報告されているが、奏功率がひくいことから、樹状細胞の抗原提示能を用いた免疫療法が期待されてきた。本プロトコルでは、DC に患者腫瘍溶解液を組み合わせているが、抗原ペプチドを用いたプロトコルよりも、腫瘍特異性が低いものの、多剤耐性トランスポーターなどを含む未知の抗原、複数の抗原を含む点で、誰にでも応用可能である利点を持つ。我々は、今回繰り返し炎症に続く腫瘍壊死反応を体験しているが、その機序は現時点では不明であるが、腫瘍血管の閉塞で腫瘍に虚血が引き起こされた可能性が考えられる。副作用についても多少のアレルギー反応が見られており、今後自己抗体の検索を行う必要があると思われる。

D. 結論

cerivastatin と cyclosporin A との相互作用のメカニズムとしては、代謝過程を考えることは、臨床濃度から考えて困難であり、OATP2 を介した肝取り込み過程における阻害は、臨床にありえる濃度範囲で起こりうることから、少なくとも一部は、トランスポーターが作用点となる相互作用であることを示唆する結果を得た。

また、biguanide 系化合物の乳酸アシドシスの発現には、Oct1 による肝取り込み能力が寄与することがあきらかとなり、また、肝における暴露量と、血中乳酸値上昇、また、ミトコンドリア呼吸鎖阻害活性がすべて相関することが明らかとなった。

OATP-遺伝子に見る変異の中で、V174A、P336R は基質薬物の体内動態に影響し、肝への取り込み能の低下が原因と考えられる。従って、肝が薬効発現の標的臓器である場合、効果減弱が予想される。また、血中濃度は上昇することから、副作用発現にも留意する必要があると考えられる。

第 IV 期悪性黒色腫患者 10 例に対して樹状細胞療法を行った。明らかな副作用は認められなかった。10 例中 3 例において腫瘍に対する反応が認められ、うち 2 例で複数の転移巣の壊死が認められた。DTH 反応や CTL 活性と腫瘍反応とは相関がなく液性免疫について検討中である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Shitara, Y., Itoh, T., Sato, H., Li, A.P. and Sugiyama Y. Inhibition of Transporter-Mediated Hepatic Uptake as a Mechanism for Drug-Drug Interaction between Cerivastatin and Cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(2), 610-616, 2003

Wang, D-S., Jonker, J.W., Kato, Y., Kusuhara, H., Schinkel, A.H. and Sugiyama, Y. Involvement of organic cation transporter 1 in the hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther*, 302, 510-515, 2002

Wang, D-S., Kusuhara, H., Kato, Y., Jonker, J.W., Schinkel, A.H. and Sugiyama, Y. Involvement of organic cation transporter 1 in the Lactic Acidosis Caused by Metformin. *Mol Pharmacol*, 63, 844-848, 2003

設楽悦久、杉山雄一 トランスポーターを介した肝

への取り込み過程で生じる薬物間相互作用 薬理と治療, 30 suppl, S425-431, 2002

楠原洋之、王徳勝、加藤将夫、杉山雄一 ビグアナイド系化合物により誘起される乳酸アシドシスへの有機カチオントランスポーター(Oct1)の関与 薬理と治療, 30 suppl, S437-439, 2002

松島総一郎、前田和哉、佐々木誠、鈴木洋史、杉山雄一、設楽悦久 ヒト OATP2 と MRP2 を同時発現させたダブルトランスフェクタントの評価

一肝臓におけるcerivastatinの経細胞輸送特性の定量的評価に向けて一 薬理と治療, 30 suppl, S441-444, 2002

Kato, Y., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. Toxicological implications of hepatobiliary transporters, *Toxicology*, 181-182, 287-290, 2002

Mizuno, N. and Sugiyama, Y. Drug Transporters: Their role and importance in the selection and development of new drugs. *Drug Metabol Pharmacokin*, 17, 93-108, 2002

Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, et al. Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: Consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*, in press (2003). 家入 一郎. トランスポーターの臨床的意義-遺伝子多型から見る薬物療法への寄与-, ファルマシア、印刷中、2003.

Zhang X., Nakaoka T., Nishishita T., Watanabe N., Igura K., Shinomiya K., Takahashi T.A., and Yamashita N. Efficient Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Expression in Human Placenta-Derived Mesenchymal Cells. *Microbiol. Immunol.* in press (2003)

Sato, K., Yamashita, N. and Matsuyama, T. Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4+ and CD8+T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments. *Cell. Immunol.*, 215, 186-194, (2002).

Sato, K., Kawasaki, H., Morimoto, C., Yamashita, N. and Matsuyama, T. An Abortive Ligand-Induced Activation of CC Chemokine Receptor (CCR)1-Mediated Downstream Signaling Event and A Deficiency of CCR5 Expression are Associated with the Hyporesponsiveness of Human Naive CD4+T cells to CCL3 and CCL5. *J. Immunol* 15,168:6263-6272, (2002)

Nagayama, H., Ooi, J., Tomonari, A., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Takahashi, T.A. Yamashita, N., and Asano, S. Severe Immune Dysfunction after Lethal Neutron Irradiation in a JCO Nuclear Facility Accident Victim.

Inter. J. Hematol. 76 157-164 (2002)

Nagayama, H., Misawa, K., Tanaka, H., Ooi, J., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Yamada, Y., Kodo, H., Takahashi, T-A., Yamashita, N., Shimazaki, S. and Asano, S. Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim Bone Marrow Transplant. 29(3):197-204, (2002)

2. 学会発表

設楽悦久、杉山雄一 トランスポーターを介した肝への取り込み過程で生じる薬物間相互作用 第10回肝病態生理研究会

楠原洋之、王徳勝、加藤将夫、杉山雄一 ビグアナイド系化合物により誘起される乳酸アシドーシスへの有機カチオントランスポーター(Oct1)の関与 第10回肝病態生理研究会

松島総一郎、前田和哉、佐々木誠、鈴木洋史、杉山雄一、設楽悦久 ヒト OATP2 と MRP2 を同時発現させたダブルトランスフェクタントの評価
—肝臓における cerivastatin の経細胞輸送特性の定量的評価に向けて— 第10回肝病態生理研究会

前田和哉、松島総一郎、設楽悦久、佐々木誠、鈴木洋史、杉山雄一 ヒト OATP2/MRP2 共発現系を用いたセリバスタチンの経細胞輸送の速度論的解析：取り込み/排泄両過程が経細胞輸送に与える影響 医療薬学フォーラム2002

設楽悦久、前田和哉、伊藤智夫、佐藤均、Albert P. Li, 杉山雄一 薬物トランスポーターを介した肝取り込み過程で生じる薬物間相互作用 第17回日本薬物動態学会

松島総一郎、前田和哉、設楽悦久、佐々木誠、鈴木洋史、杉山雄一 ヒト OATP2/MRP2 共発現系を用いた cerivastatin の経細胞輸送の解析 第17回日本薬物動態学会

設楽悦久、平野雅、佐藤均、杉山雄一 セリバスタチンとシクロスポリンおよびゲムフィブロジルとの相互作用 日本薬剤学会第18年会

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

副作用発現の原因となるトランスポーターの *in vitro* 実験系による同定および *in vivo* 臨床データ解析

主任研究者 杉山 雄一 東京大学・大学院薬学系研究科 教授

研究要旨 cerivastatin は cyclosporin A と併用時に臨床で血中濃度が上昇し、重篤な副作用が生じることが知られているが、そのメカニズムは不明であった。そこで、トランスポーターを介した相互作用である可能性を立証するために、OATP2 遺伝子発現系を用いた解析を行った。その結果、cerivastatin は OATP2 を介して輸送され、その取り込みは、cyclosporin A によって阻害され、ヒト凍結肝細胞において cyclosporin A による取り込み阻害の親和性は、OATP2 発現系による阻害の程度と一致し、OATP2 を介した肝取り込み過程の相互作用である可能性が示唆された。また、biguanide 系糖尿病薬は、時に乳酸アシドーシスとよばれる副作用を示す。一方、biguanide が Oct1 ノックアウトマウスにおいては、血中濃度推移は大きくは変わらないものの、肝臓内濃度は有意に低下がみられ、また肝臓内濃度と乳酸値が相関することから、Oct1 による肝臓への取り込み量が副作用の強度を決定づけていることが明らかとなった。

A.研究目的

薬物の副作用発現の主なメカニズムとして、薬物間相互作用などによる血中濃度の予期せぬ上昇や副作用組織への集積など、薬物動態学的な要因が考えられる。これまでの研究で、薬物相互作用の作用点や、薬物動態を決定付ける要因として第1相酸化代謝反応を司る CYP P450 や、第2相抱合反応を行う各種抱合酵素に関する研究が進められてきた。一方で、我々の研究グループをはじめとして近年、肝臓や腎臓といった主要なクリアランス臓器を中心として、多くの薬物トランスポーター群のクローニング・機能解析が進み、薬物動態を決定付ける要因の一つとして新たにトランスポーターに焦点が当たりつつある。しかしながら、*in vitro* 実験系で、あるトランスポーターの基質輸送および阻害特性を定性的に検討した研究はあるが、それが *in vivo* において臨床において本当に起こりうる事象なのかを定量的な考察を加えながら行われた研究は例を見ない。今年度は、肝臓の取り込み過程に存在するトランスポーターをターゲットにして、有機アニオン、有機カチオンの輸送にそれぞれ関与すると考えられている OATP(organic anion transporting polypeptide) 2 および Oct(organic cation transporter) 1 が絡むと考えられる副作用発現機構について2つの実際に臨床で問題となっている事象を *in vitro* 実験から定量的に説明可能であるかを検討することを目標とした。前者は、cerivastatin が、cyclosporin A との併用により、血中濃度が臨床でも上昇し、横紋筋融解症

といった致命的な相互作用を生じさせることが明らかとなっているが、それが、トランスポーターOATP2 を介した肝取り込み過程にあるという仮説を立証する実験を試みた。また後者は、biguanide 系抗糖尿病薬が、時として乳酸アシドーシスといった重篤な副作用を示すが、このメカニズムとして、Oct1 による肝取り込みの程度が副作用を決定するという仮説を立て、*in vitro* 発現系と Oct1 ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 実験を行った。

B.研究方法

- 1) cerivastatin(CER)と cyclosporin A(CsA)の薬物間相互作用メカニズムの解析
CER の ^{14}C 標識体ならびに非標識体を用いて、OATP2 遺伝子発現 MDCKII 細胞ならびにヒト凍結肝細胞による取り込み実験および CsA による取り込み阻害実験を試みた。また、代謝阻害の影響を考慮するため、ヒト肝臓ミクロソームを用いた代謝阻害実験も試みた。
- 2) biguanide 系化合物(metformin を中心に)の乳酸アシドーシス発現における Oct1 の関与
biguanide 系化合物(metformin, phenformin, buformin)の輸送を、Oct1 遺伝子発現 CHO 細胞を用いて検討した。また、Oct1(-/-)ノックアウトマウスと正常マウスにそれぞれ化合物を投与し、血中濃度推移や全身の薬物分布について検討した。また、同時に両マウスに化合物を投与後の血中乳酸値の変動

を確認し、同時にラット遊離肝細胞において化合物の共存下における酸素消費量の変動も合わせて評価した。

C.研究結果

1) cerivastatin(CER)と cyclosporin A(CsA)の薬物間相互作用メカニズムの解析

ヒト凍結肝細胞を用いてCERの取り込みを観察したところ、親和定数 $K_m=3\sim 18\mu\text{M}$ の飽和性ある取り込みがみられた。また、CsA は、その取り込みを濃度依存的に阻害し、その阻害定数 $K_i=0.28\sim 0.69\mu\text{M}$ とかなり高親和性の阻害を示した。また、OATP2 遺伝子発現細胞への取り込み実験を試みた結果、ベクター導入細胞に比べて有意な取り込みが観察され、CsAによる阻害の K_i 値は、 $0.24\mu\text{M}$ と算出され、ヒト凍結肝細胞において見られた K_i 値とほぼ同一の値となった。一方、ヒト肝ミクロソームを用いた代謝阻害実験の結果から、CsA は高濃度域($>10\mu\text{M}$)においてもCERの代謝を阻害しないことがわかった。

2) biguanide 系化合物(metformin を中心に)の乳酸アシドーシス発現における Oct1 の関与

biguanide 系化合物 3 種 (metformin, phenformin, buformin)について Oct1 発現系を用いて取り込み実験を試みた結果、各化合物ともベクター導入細胞と比較して有意な取り込みが観察され、その K_m は、metformin($377\mu\text{M}$) > buformin($48.8\mu\text{M}$) > phenformin($15.6\mu\text{M}$) であった。また、metformin に関して、Oct1(+/-)ノックアウトマウスと、正常マウスに静脈内投与した後の、血漿中濃度推移ならびに臓器分布を検討したところ、血漿中濃度推移は、Oct1(+/-)ノックアウトマウスにおけるほうが若干高い程度の変化であったが、肝臓中濃度については、Oct1(+/-)において、正常マウスの約 30 倍もの顕著に低い分布が見られた。一方、血中乳酸濃度を metformin の i.v.持続投与下で Oct1(+/-)と正常マウスで測定したところ 120 分後くらいから上昇が見られ、その上昇の程度は、正常マウスの方が有意に高かった。またその上昇具合は、3 種の薬物を用いたところいずれも投与量依存性を示し、定常状態の非結合型薬物の血漿中濃度と乳酸値の AUC の上昇との間には、いずれの薬物においても sigmoid curve の関係が成り立ち、 EC_{50} は、metformin($734\mu\text{M}$) > buformin($119\mu\text{M}$) > phenformin($4.97\mu\text{M}$)となった。また、ラット遊離肝細胞を用いて、3 種の薬物と濃度を変えて接触させ、その

ときの酸素消費量を測定したところ、酸素消費が 75%まで阻害される濃度 IC_{75} と、乳酸値の上昇の EC_{50} との間には順位の相関が見られた。

D.考察

cerivastatin(CER)と cyclosporin A(CsA)の薬物間相互作用メカニズムの解析において、CER のヒト凍結肝細胞における取り込みの CsA による阻害の程度(K_i 値)は、OATP2 発現細胞における値とほぼ同等であること、さらに、CsA の肝臓での最大非結合型濃度も大体同じ値をとることから、実際のヒト臨床においても、肝取り込み過程の相互作用がおきうることが示唆され、またその作用点は、おそらく OATP2 であろうことが考えられた。一方で、CER は肝臓中で、CYP2C8 と 3A4 により代謝を受けることから、代謝過程における相互作用の可能性も考えられたが、代謝実験の結果から、CsA は、高濃度用いても CER の代謝は部分的にしか阻害されず、臨床での濃度から考察すると代謝の相互作用は考えにくいという結論に至った。OATP2 は、ヒト肝臓に特異的に発現が認められるトランスポーターであり、多様な基質特異性を示すことから、多くの主に有機アニオン系薬物の取り込みに重要な役割を果たしていることが考えられており、このトランスポーターを介した相互作用が多くの薬物でおこりうることが示唆され、今後いろんな事例がでてくることが推察される。本研究は、初めてトランスポーターを介した相互作用を定量的に解析した研究であり、相互作用の作用点としてトランスポーターも今後考えなければならぬという警鐘を鳴らす意味で重要であると考えられる。

また、biguanide 系化合物の副作用である乳酸アシドーシスは、Oct1(+/-)マウスにおいて正常マウスと比較して、血中濃度推移はあまり大差ないものの、肝臓への臓器分布が極度に減少しており、同時に化合物投与時の、血中乳酸値の上昇が少ないことから、Oct1 によって肝臓中に取り込まれる能力が副作用の発現を決定付けることが示唆された。また、乳酸アシドーシスの機序として、ミトコンドリアにおける呼吸鎖の阻害があげられ、それを評価する系として、ラット遊離肝細胞を用いて、酸素消費の化合物による阻害を検討した結果、その IC_{75} 値は、in vivo において乳酸値上昇の EC_{50} 値と順位相関がとれることから、本系がこの副作用を評価するための簡便な実験系として用いられることを示した。今後、Oct1 により取り込まれる能力が小さく、かつ、肝取り込み

過程の Km 値が、ミトコンドリアでの呼吸鎖阻害の IC50 値より小さい値をとるような薬物を創生できれば、より安全な biguanide 系薬物が実現するかもしれない、現在更なる検討を進めている。

E. 結論

cerivastatin と cyclosporin A との相互作用のメカニズムとしては、代謝過程を考えることは、臨床濃度から考えて困難であり、OATP2 を介した肝取り込み過程における阻害は、临床上ありえる濃度範囲で起こりうることから、少なくとも一部は、トランスポーターが作用点となる相互作用であることを示唆する結果を得た。

また、biguanide 系化合物の乳酸アシドーシスの発現には、Oct1 による肝取り込み能力が寄与することがあきらかとなり、また、肝における暴露量と、血中乳酸値上昇、また、ミトコンドリア呼吸鎖阻害活性がすべて相関することが明らかとなった。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shitara, Y., Itoh, T., Sato, H., Li, A.P. and Sugiyama Y. Inhibition of Transporter-Mediated Hepatic Uptake as a Mechanism for Drug-Drug Interaction between Cerivastatin and Cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(2), 610-616, 2003

Wang, D-S., Jonker, J.W., Kato, Y., Kusuhashi, H., Schinkel, A.H. and Sugiyama, Y. Involvement of organic cation transporter 1 in the hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther*, 302, 510-515, 2002

Wang, D-S., Kusuhashi, H., Kato, Y., Jonker, J.W., Schinkel, A.H. and Sugiyama, Y. Involvement of organic cation transporter 1 in the Lactic Acidosis Caused by Metformin. *Mol Pharmacol*, 63, 844-848, 2003

設楽悦久、杉山雄一 トランスポーターを介した肝への取り込み過程で生じる薬物間相互作用 薬理と治療, 30 suppl, S425-431, 2002

楠原洋之、王徳勝、加藤将夫、杉山雄一 ビグアナイド系化合物により誘起される乳酸アシドーシスへの有機カチオントランスポーター(Oct1)の関与 薬理と治療, 30 suppl, S437-439, 2002

松島総一郎、前田和哉、佐々木誠、鈴木洋史、杉山雄一、設楽悦久 ヒト OATP2 と MRP2 を同時発現させたダブルトランスフェクタントの評価 一肝臓における cerivastatin の経細胞輸送特性の

定量的評価に向けて一 薬理と治療, 30 suppl, S441-444, 2002

Kato, Y., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. Toxicological implications of hepatobiliary transporters, *Toxicology*, 181-182, 287-290, 2002
Mizuno, N. and Sugiyama, Y. Drug Transporters: Their role and importance in the selection and development of new drugs. *Drug Metabol Pharmacokin*, 17, 93-108, 2002

2. 学会発表

設楽悦久、杉山雄一 トランスポーターを介した肝への取り込み過程で生じる薬物間相互作用 第10回肝病態生理研究会

楠原洋之、王徳勝、加藤将夫、杉山雄一 ビグアナイド系化合物により誘起される乳酸アシドーシスへの有機カチオントランスポーター(Oct1)の関与 第10回肝病態生理研究会

松島総一郎、前田和哉、佐々木誠、鈴木洋史、杉山雄一、設楽悦久 ヒト OATP2 と MRP2 を同時発現させたダブルトランスフェクタントの評価 一肝臓における cerivastatin の経細胞輸送特性の定量的評価に向けて一 第10回肝病態生理研究会

前田和哉、松島総一郎、設楽悦久、佐々木誠、鈴木洋史、杉山雄一 ヒト OATP2/MRP2 共発現系を用いたセリバスタチンの経細胞輸送の速度論的解析: 取り込み/排泄両過程が経細胞輸送に与える影響 医療薬学フォーラム2002

設楽悦久、前田和哉、伊藤智夫、佐藤均、Albert P. Li, 杉山雄一 薬物トランスポーターを介した肝取り込み過程で生じる薬物間相互作用 第17回日本薬物動態学会

松島総一郎、前田和哉、設楽悦久、佐々木誠、鈴木洋史、杉山雄一 ヒト OATP2/MRP2 共発現系を用いた cerivastatin の経細胞輸送の解析 第17回日本薬物動態学会

設楽悦久、平野雅、佐藤均、杉山雄一 セリバスタチンとシクロスポリンおよびゲムフィブロジルとの相互作用 日本薬剤学会第18年会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究要旨 3種類のアニオントランスポーター(OATP-C, OAT3, MRP2)遺伝子多型とプラバスタチン(PST)の体内動態との関連を遺伝子型で層別した日本人健常成人 23名を対象とし評価した。また、日本人における3遺伝子解析を行い、変異の同定と頻度を明らかとした(n=120)。遺伝子解析の結果、OATP-C, OAT3 遺伝子にそれぞれ12種類、1種類のアミノ酸置換を伴う変異を同定した。体内動態との関連では、MRP2は直接および間接型ビリルビン濃度、OAT3はPSTの腎クリアランス(CL_r)を指標に評価を加えた結果、同定した変異の影響は見られなかった。一方、OATP-Cについては、特にVal174AlaあるいはPro336Argを有する被検者で有意に高い血中濃度推移が得られ、腎外クリアランス(CL_{nr})の低下あるいは吸収率の増加が示唆された。両変異は膜貫通領域に位置することから輸送能の低下の原因となり得、肝への取り込みの低下が生じるものと考えられた。両変異を有する患者では、薬効の低下とともに、血中濃度上昇に伴う副作用が懸念される。

A.研究目的

薬物トランスポーター遺伝子多型と基質薬物の体内動態との関連を評価することで、生体中での機能を明らかにし、副作用を含む薬効に見られる大きな個人差の原因を解明し、医薬品開発や適正使用の基盤とする。

B.研究方法

(1)遺伝子解析：OATP-C, OAT3, BCRP, 3種のトランスポーター遺伝子多型解析を行った。対象は120名の健常成人日本人で、翻訳領域を中心に実施した。SSCPによるスクリーニングの後、direct sequence、cloning→sequenceにより同定した。

(2)臨床試験：OATP-C, OAT3, MRP2 遺伝子型が既知の健常成人ボランティア 23名を対象とし、共通の基質薬物であるプラバスタチン(PST)を投与し、体内動態との関連を評価した。OATP-Cは体内動態パラメーター全般で、OAT3は腎クリアランスで、MRP2機能は血中のビリルビン濃度で評価した。

(倫理面への配慮) 遺伝子解析に使用したDNAは健常成人より得たが、薬物動態関連遺伝子の多型解析のみに限定された連結不可能匿名化された試料であり、本研究の目的等、倫理指針に準拠した説明を行い、書面による承諾を得た後に使用した。臨床試験は臨床試験専門の医療機関で行い、実施については当該施設の倫理審査委員会にて承認を受けた。また、本研究に関する遺伝子解析は鳥取大学医学部倫理審査委員会にて審査・承認を受けた。

C.研究結果

本研究を通して、以下の知見が得られた。
(1). OATP-C 遺伝子解析の結果、12種類の変異を同定し、5種類がアミノ酸の置換を伴っていた; N130D, N151S, V174A, P336R。また、N130D、V174Aはhaplotype(*15)であった。
(2). OAT3 遺伝子解析の結果、5種類の変異を同定し、1種類がアミノ酸の置換を伴っていた:S789V。
(3). BCRPでは20種類の変異を同定し、6種類がアミノ酸置換やstop codonの原因となる。
(4). 臨床試験の結果、被検者に認めたMRP2変異(V417I, S789F)、OAT3変異(T723A, S789V)はそれぞれの表現型の指標に影響を及ぼさなかった。
(5). OATP-C 遺伝子多型とPST体内動態について検討を行った結果、N130D変異の有無による体内動態の変化は見られなかった。これに対し、V174A保有群では、有意なAUCの上昇、腎外クリアランスの低下が観察された。また、ホモ型変異保有者は少ないが、体内動態の変化にはgene dose effectが観察された。さらに、P336R変異保有者もV174Aと同程度の体内動態挙動が観察された。

D.考察

本研究では、OATP-C 遺伝子多型が基質薬物の体内動態に大きく関与することが明らかとなった。変異の中では、特に、拮抗薬の親和性に相違を有することが明らかになった。V174A, P336Rが重要と言え、両変異とも機能に大きく影響することが指摘さ

れている膜貫通領域に存在する。体内動態への関与は、変異により AUC の有意な上昇であり、腎外クリアランスの低下あるいは吸収率の上昇がその原因と考えられる。共同研究者による *in vitro* 発現実験や他の研究者による報告では、V174A 変異による輸送機能の低下が指摘されており、本臨床試験で得られた結果は、*in vitro* 実験結果と一致しており、今回評価した OATP-C 遺伝子変異による PST の肝への取り込みが低下した結果と考えられる。PST をはじめとするスタチン系薬剤は肝に取り込まれることで、主作用であるコレステロール生成を阻害する。従って、変異保有者では薬効の低下が予想される。さらに、スタチン系薬剤には横紋筋融解症などの副作用が知られており、発症メカニズムは不明であるが、高い血中濃度の維持が危険因子とされていることから、効果の減弱とともに、副作用発現の危険性が示唆される。患者を対象とした臨床試験により確認が望まれる。

E. 結論

OATP-遺伝子に見る変異の中で、V174A、P336R は基質薬物の体内動態に影響し、肝への取り込み能の低下が原因と考えられる。従って、肝が薬効発現の標的臓器である場合、効果減弱が予想される。また、血中濃度は上昇することから、副作用発現にも留意する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, et al. Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: Consequences for pravastatin pharmacokinetics. Clin Pharmacol Ther, in press (2003).
家入一郎. トランスポーターの臨床的意義-遺伝子多型から見る薬物療法への寄与-, ファルマシア、印刷中、2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究要旨 第Ⅳ期悪性黒色腫患者10例を対象に、腫瘍溶解液を用いた樹状細胞療法第Ⅰ相研究を行なった。未成熟樹状細胞（iDC）は、患者末梢血単核球を顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）とIL-4存在下に1週間培養して得た。さらに腫瘍溶解液を添加した後TNF α で成熟樹状細胞（mDC）を得た。1 \times 10⁷細胞を週に一度患者皮内に接種し、また35万～70万単位のIL-2を週3日皮下接種した。10例中SD（stable disease）1名、MR（mixed response）2名、PD7名の結果であった。追加接種を行なったMRの2症例では、複数ヶ所で炎症反応を伴う腫瘍壊死とそれに続く縮小あるいは消失が認められた。これらの機序は現在のところ不明であるが、今後の腫瘍免疫治療を進めていく上で極めて示唆に富む所見であると考えられた。また細胞接種期間中、治療に起因すると思われる副作用は認めなかったが、自己免疫の誘導については患者血清を用いてさらなる検討が必要である。

A.研究目的

近年、強力な抗原提示細胞である樹状細胞（dendritic cells: DC）の研究が進み、この細胞に癌抗原を提示させ抗腫瘍免疫反応を誘導させようという試みが臨床の場で行なわれつつある。我々の施設においても第Ⅳ期の悪性黒色腫患者を対象として、自己末梢血由来樹状細胞を用いた第Ⅰ相臨床研究を開始し10例の患者を治療した。その目的は安全性の確認、腫瘍免疫の誘導の検討、及び腫瘍の反応である。

B.研究方法

1. 対象患者

治験審査委員会承認されたプロトコルをもとに、各症例に対して院内での症例適応会議が行われた。選択基準（他の治療が無効な第Ⅳ期メラノーマ症例、種々の検査値が基準を満たしていることなど）の確認とともに、除外基準（performance statusが3以上、コントロール不能な感染症を有する症例、あるいは心、肺、肝、腎に重篤な基礎疾患を有する症例、治療前4週間以内に他の免疫治療や放射線照射を受けている症例）に該当していないことも確認された。

2. DC療法のプロトコル

患者からアフエレーシスとフィコール法にて末梢血単核球を得、フラスコ付着細胞にGM-CSFとIL-4を添加して1週間培養、未熟DCを作製した。その後腫瘍

溶解液を加えさらにTNF- α を添加して4日間培養し、成熟DCとした細胞（1 \times 10⁷個）を患者皮内に接種した。細胞接種は1週間に1回行い、また同日より3日間IL-2を35～70万単位/日皮下注射した。計10回の細胞接種予定とし、その前後で、画像検査を行い腫瘍計測評価した。また、自己単核球と腫瘍細胞に対する遅延型皮膚アレルギー反応検査（DTH）や治療前後でのCTLアッセイ等も施行した。追加接種の10回については前回と同様のプロトコルとしたが、以降の追加接種に関しては2週間に1回接種を4回、1ヶ月に1回接種を6回とし、またIL-2に関しては、DC接種当日から70万単位/日 \times 3日間に変更した。

（倫理面への配慮）本研究は、東京大学医科学研究所における治験審査委員会承認されたプロトコルをもとに、各症例に対して院内での症例適応会議の判断に基づきおこなった。

C.研究結果

1. 患者背景と投与結果

今回の第Ⅰ相臨床研究にエントリーした10名の患者の年齢は24～75歳で、男性5名、女性5名であった。1例を除いてはすでに手術切除・化学治療が先行しており、これ以上の治療法が望めない遠隔転移を伴う第Ⅳ期悪性黒色腫患者であった。樹状細胞の誘導に関して、すべての患者より安定した数のDCの誘導を行なうことが可能であった。表面マーカーをフローサイトメトリーで解析し、誘導したDCの確認を

全症例で行なった (CD14陰性、CD86、HLA-class I、HLA-class II陽性など)。計10回のDC接種を行なうプロトコルであったが、原病の進行が著しく途中で治療を中止した症例が4症例あり、最終的に10症例中SD1名、MR2名、PD7名の結果となった。免疫学的効果の評価について、DTHと治療反応性との相関は認めなかった。CTL活性については、SD、MRの症例でその増加が認められたが、PDの症例でも同様の結果が得られ、解釈は困難であった。追加接種を行なったMRの2症例では経過中、複数ヶ所で炎症反応を伴った腫瘍壊死反応、その後の腫瘍の縮小や消失が認められた。抗核抗体、リウマチ因子などの自己抗体については治療後に陽性となった症例はいなかった。

2. 反応の認められた患者について

反応の認められた症例8は58歳女性である。第1コースのDC接種経過中に、一部の腫瘍に不変～やや縮小程度の反応が認められた。全身状態が良好で治療継続が患者にとって有益であるとの判断から追加治療が承認され、第2コースのDC接種をおこなった。この間新たな転移巣の出現や、不変～増大の病変もある一方、肝左葉前面・前縦隔・脾臓後面などで転移腫瘍の中心部壊死が確認された。前縦隔部腫瘍では壊死に伴い周囲に若干の出血・炎症を伴ったが保存的に軽快した。患者の全身状態はよく保たれており、治療のない期間は自宅で過ごせる状態であった。これらの結果を総合判断し、さらに追加のDC接種が承認され、第3コースが行なわれた。この期間中、新出病変が多数出現する一方、左腎外側の径10cm以上もある転移腫瘍の壊死をはじめ、胸腔内・腹腔内の各所転移巣で同様の中心部壊死を認めた。多数の皮下転移も認められたが、うち数ヶ所において発赤・疼痛に続く内部壊死の所見も得ている。これらの壊死に伴う出血・炎症に伴い腫瘍の存在場所により胸膜炎・腹膜炎を起こす事があったが、保存的に軽快した。計30回のDC接種期間中、開始より約半年以降より転移腫瘍が壊死に陥る反応が各所で次々に認められた。最終的に腸間膜の病変の拡大と崩壊によるよるイレウスと腹腔内出血・癌性腹膜炎によって治療開始から1年8ヶ月後に永眠された。

症例9は57歳の男性で、悪性黒色腫の診断を受けた後、手術・化学療法を行なったが効果を認めず当院に紹介となった。全身評価と症例検討会を経て、DC接種を開

始した。10回の接種期間中、約60ヶ所あった肺転移巣のほとんどが消失した。第2コースの追加接種が行なわれたが、この間は胸膜転移巣の大きさに著明な増大を認めず、副腎転移巣に関しては増大した。この患者も全身状態は極めて良好で、治療の継続が患者にとって有益との判断から第3コースの追加接種が行なわれた。この間に右胸部の痛みが先行しCT上胸膜転移の内部壊死が確認された。この際、右胸水貯留も認められたが、細胞診でclass IIであった。胸膜炎症状は軽快し治療が中断することはなかった。計30回を終了した時点での評価は、右中肺野の残存肺転移は大きさ不変、胸膜転移に関しては大きさ不変のもの、壊死→縮小したもの、増大したものがあり、左副腎転移は増大であった。最終的には治療開始2年後に呼吸不全のため永眠された。

症例8と9について、治療前後の血清で腫瘍に反応する抗体が変化するか否かを検索中である。また抗核抗体やリウマチ因子以外の自己抗体の存在についても検索中である。

D. 考察

悪性黒色腫に対しては以前から様々な免疫治療が試みられ、BCG (Bacille Calmette-Guérin) 接種やlymphokine-activated killer (LAK)、IL-2などのサイトカイン投与などによる非特異的免疫を賦活させる試みなど数多く報告されたが、奏効率は低く、さらなる研究が続けられることとなった。近年の腫瘍特異抗原・ペプチドの同定やDCによる強力な免疫誘導などの解析から、これらを利用した腫瘍免疫療法プロトコルが試みられてきている。しかし、効果についてもさらなる検討が必要であると思われ、未だ確立した治療とはいえないのが現状であろう。我々のプロトコルではDCに患者腫瘍溶解液を組み合わせているが、ペプチドを用いたプロトコルでは腫瘍特異性が高い、誘導されたペプチド特異的CD8+細胞がテトラマー解析により確認できるなどの利点があるが、HLA型に拘束されるため適応に限られる他、腫瘍の抗原消失などの問題もある。腫瘍全体を用いる場合には、腫瘍特異性は落ちるが未知の抗原・複数の抗原を含む、どのHLA型に患者へも応用できるなどの利点がある。これまで報告された腫瘍免疫治療臨床研究で我々が今回繰返し経験したような炎症に続く腫瘍壊死反応について

記載はない。DC治療が何らかの誘因となっていると考えるが現在その機序は不明である。病理検索ができたものについては治療前後で腫瘍内のCD8+細胞の増加が認められているが、CTで認められるような急激な腫瘍の内部壊死を考慮すると、何らかの機序により腫瘍血管の閉塞が起こり腫瘍に虚血が引き起こされたことが示唆される。副作用についてはDC接種部の軽度の皮膚の発赤以外に明らかなものは認められなかった。また抗核抗体、リウマチ因子についても治療後に変化することはなかったが、さらなる自己抗体の検索を行い自己免疫の誘導の可能性を否定する必要がある。

E. 結論

第IV期悪性黒色腫患者10例に対して樹状細胞療法を行った。明らかな副作用は認められなかった。10例中3例において腫瘍に対する反応が認められ、うち2例で複数の転移巣の壊死が認められた。DTH反応やCTL活性と腫瘍反応とは相関がなく液性免疫について検討中である。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

- (1) Zhang X., Nakaoka T., Nishishita T., Watanabe N., Igura K., Shinomiya K., Takahashi T.A., and Yamashita N. Efficient Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Expression in Human Placenta-Derived Mesenchymal Cells. *Microbiol. Immuno.* in press (2003)
- (2) Sato, K., Yamashita, N. and Matsuyama, T. Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4+ and CD8+T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments. *Cell. Immunol.*, 215, 186-194, (2002).
- (3) Sato, K., Kawasaki, H., Morimoto, C., Yamashita, N. and Matsuyama, T. An Abortive Ligand-Induced Activation of CC Chemokine Receptor (CCR)1-Mediated Downstream Signaling Event and A Deficiency of CCR5 Expression are Associated with the Hyporesponsiveness of Human Naïve CD4+T cells to CCL3 and

CCL5. *J. Immunol* 15,168:6263-6272, (2002)

- (4) Nagayama, H., Ooi, J., Tomonari, A., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Takahashi, T.-A., Yamashita, N., and Asano, S. Severe Immune Dysfunction after Lethal Neutron Irradiation in a JCO Nuclear Facility Accident Victim. *Inter. J. Hematol.* 76 157-164 (2002)
- (5) Nagayama, H., Misawa, K., Tanaka, H., Ooi, J., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Yamada, Y., Kodo, H., Takahashi, T.-A., Yamashita, N., Shimazaki, S. and Asano, S. Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim *Bone Marrow Transplant.* 29(3):197-204, (2002)

H.知的財産権の出願・登録状況 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shitara, Y., Itoh, T., Sato, H., Li, A.P. and Sugiyama Y.	Inhibition of Transporter-Mediated Hepatic Uptake as a Mechanism for Drug-Drug Interaction between Cerivastatin and Cyclosporin A	J Pharmacol Exp Ther	304	610-616	2003
Wang, D-S., Jonker, J.W., Kato, Y., Kusuhara, H., Schinkel, A.H. and Sugiyama, Y.	Involvement of organic cation transporter 1 in the hepatic and intestinal distribution of metformin.	J Pharmacol Exp Ther	302	510-515	2002
Wang, D-S., Kusuhara, H., Kato, Y., Jonker, J. W., Schinkel, A.H. and Sugiyama, Y.	Involvement of organic cation transporter 1 in the Lactic Acidosis Caused by Metformin	Mol. Pharmacol	63	844-848	2003
設楽悦久, 杉山雄一	トランスポーターを介した肝への取り込み過程で生じる薬物間相互作用	薬理と治療	30 suppl	S425-431	2002
楠原洋之, 王徳勝, 加藤将夫, 杉山雄一	ビグアナイド系化合物により誘起される乳酸アシドーシスへの有機カチオントランスポーター (Oct1) の関与	薬理と治療	30 suppl	S437-439	2002
松島総一郎, 前田和哉, 佐々木誠, 鈴木洋史, 杉山雄一, 設楽悦久	ヒト OATP2 と MRP2 を同時発現させたダブルトランスフェクタントの評価—肝臓における cerivastatin の経細胞輸送特性の定量的評価に向けて—	薬理と治療	30 suppl	S441-444	2002
Kato, Y., Suzuki, H. and Sugiyama, Y.	Toxicological implications of hepatobiliary transporters	Toxicology	181-182	287-290	2002
Mizuno, N. and Sugiyama, Y.	Drug Transporters: Their role and importance in the selection and development of new drugs.	Drug Metabol Pharmacokin	17	93-108	2002
Nishizato, Y., Ieiri, I., Suzuki, H., et al.	Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: Consequences for pravastatin pharmacokinetics	Clin Pharmacol Ther		in press	2003
家入一郎	トランスポーターの臨床的意義—遺伝子多型から見る薬物療法への寄与—	ファルマシア		印刷中	2003
Zhang X., Nakaoka T., Nishishita T., Watanabe N., Igura K., Shinomiya K., Takahashi T.A., and Yamashita N	Efficient Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Expression in Human Placenta-Derived Mesenchymal Cells.	Microbiol. Immuno		in press	2003
Sato, K., Yamashita, N. and Matsuyama, T.	Human Peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4+ and CD8+ T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments	Cellular Immunology	215	186-194	2002

発表者氏名.	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sato,K.,Kawasaki,H., Morimoto,C., Yamashita,N. and Matsuyama,T	An abortive Ligand-Induced Activation of CCR1-Mediated Downstream Signaling Event and a Deficiency of CCR5 Expression are Associated with the Hyporesponsiveness of Human Native CD4+ T Cells to CCL3 and CCL5 ¹	The Journal of Immunology	168	6263-6272	2002
Nagayama,H., Ooi,J., Tomonari,A., Iseki,T., Tojo,A., Tani,K., Takahashi,T.A., Yamashita,N.and Asano,S.	Severe Immune Dysfunction after Lethal Neutron Irradiation in a JCO Nuclear Facility Accident Victim	International Journal of Hematology	76	157-164	2002
Nagayama,H., Misawa,K., Tanaka,H., Ooi,J., Iseki,T., Tojo,A., Tani,K., Yamada,Y.,Kodo,H., Takahashi,T.A., Yamashita,N., Shimazaki,S. and Asano,S.	Cord blood stem cells Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim	Bone Marrow Transplantation	29	197-204	2002

20020785

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.14- P.15の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。