

## 動物を用いたヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター・薬理部  
研究者 大野 泰雄

### 分担研究者

- |                          |      |
|--------------------------|------|
| (1)東北大学大学院薬学研究科 薬物動態学分野  | 山添 康 |
| (2)東京大学大学院薬学系研究科 製剤設計学教室 | 杉山雄一 |
| (3)三共(株)薬剤動態研究所          | 池田敏彦 |
| (4)塩野義製薬(株)新薬研究所         | 大野浩司 |
| (5)藤沢薬品工業(株)薬物動態研究所      | 丹波俊朗 |
| (6)大日本製薬(株)薬物動態研究所       | 藤井敏彦 |

### 要旨

ヒト肝における抗癌薬(tegafur など)の代謝活性とそれらの作用点チミジル酸合成酵素遺伝子の5-非翻訳領域くり返し配列数に個体差があることを示した。また、各種のヒト型酵素誘導評価系と OTP2 と MRP2 発現輸送能評価系を構築・評価した。

### 1. 研究目的

ヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法の構築と薬物動態における変動巾を規定する因子を解明するために、本研究では、1) 代謝動態特性の個体間変動とその要因に関する研究として、フッ化ピリミジン系抗癌剤などの薬物代謝能の個体差について検討するとともに、遺伝的要因について検討する。2) 代謝酵素誘導能検索系として、非げっ歯類肝細胞を用いて各種誘導剤の影響を検討し、ヒトとの酵素誘導の差を検討する。また、ヒト型の *in vitro* 及び *in vivo* 酵素誘導能試験系として、ヒト型プロモーターを組み込んだ試験系の開発を行う。3) トランスポーター発現細胞を用いた薬物輸送、排泄能力の予測に関する研究として、*in vivo* における吸収率を予測できる *in vitro* 実験系を確立するために、排出トランスポーターの遺伝子発現系を構築し、輸送の評価を行う。また、薬物輸送活性の評価および、薬物の取り込み過程で生じる薬物間相互作用について検討する。これらの研究を通じてヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子について明らかにする。

### 2. 研究方法

1) 代謝に関する個体差の研究では、米国より入手したヒト肝ミクロソームおよび上清画分を用い、FT(Tegafur)または 5-DFUR (Doxifluridine)、EE2(エチルエストラジオール)および Procainamide の代謝能を測定した。また、TYMS 遺伝子のくり返し配列多型のタイピング法の確立、多型配列のクローニングおよび塩基配列の確認のためには、PCR 法で増幅後、アガロースゲル電気泳動で PCR 産物の DNA 鎖長を測定した。また、樹立ヒト由来株細胞の 5-FU、5-フルオロウリジン (FUdR) に対する感受性は薬物暴露後、細胞をクリスタルバイオレットで染色し 50%細胞増殖阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を求めた。

2) 酵素誘導研究では、ビーグルイヌに薬物を経口投与した後、肝ミクロソームを調製し、CYP3A 及び CYP1A1/2 のマーカー酵素活性を測定した。また、肝組織片から RNA を抽出し定量的 RT-PCR 法を用いて CYP1A1, 1A2, 2B11, 2C21 及び 3A12 の発現量および ELISA 法による酵素タンパクレベルの変動も解析し定量的 RT-PCR 法の結果と比較した。また、ラット、サル、及びビーグルイ

ヌから採取した肝臓より肝実質細胞を単離し培養を行い、細胞を Rifampicin 又は Omeprazole に暴露させマーカー酵素活性の変動から CYP 誘導能或いはグルクロン酸抱合活性を測定した。

3) ヒト CYP3A4 遺伝子誘導能を評価するために、CYP3A4 の遺伝子上流域(-362~+11bp および-7kbp 付近)とルシフェラーゼ遺伝子を挿入した組換えアデノウイルス(AdCYP3A4-362 および AdCYP3A4-362-7k)を用いたレポーターアッセイ系を構築し、HepG2 細胞に導入し、CYP3A 誘導作用を有する薬物を用いて、CYP3A4 誘導能を測定した。

4) 肝臓の有機アニオン系薬物の経細胞輸送モデルとして、極性を有する MDCK II 細胞を用いて、肝特異的な発現を示し広範な基質特異性を有する 2 種のトランスポーター、即ち OATP2 (organic anion transporting polypeptide 2)を basal 側に、MRP2 (multidrug resistance associated protein 2)を apical 側に発現した double-transfectant を構築し、薬物の経細胞輸送を検討した。

### 3. 研究成果

#### 1) 薬物代謝活性の個体差に関する研究

12 人の白人由来ヒト肝サンプルを用いて検討した結果、テガフル(FT)から 5-FU の変換活性は、ミクロソーム画分および上清画分でそれぞれ約 18 倍および約 5 倍の個体差が認められた。ドキシフルリジン(5-DFUR)から 5-FU への変換活性は、それぞれ、約 16 倍以上および約 2 倍の個体差が認められた。なお、5-DFUR の活性化については圧倒的に上清画分の寄与が大きいことが示された。FT, 5-DFUR から 5-FU への変換活性は共に、ミクロソーム画分では CYP2A6 活性に相関が認められた( $r=0.624$  及び  $0.774$ )。上清画分では thymidine phosphorylase(dThdPase)に相関が認められた( $r=0.753$  及び  $0.889$ )。

72 株の日本人由来細胞株について、TYMS 遺伝子 5'-非翻訳領域のくり返し配列数の多型を調べた。その結果くり返し回数 2~5 の出現頻度はそれぞれ、0.18、0.80、0.007、0.014 であった。なお、頻度が高いくり返し数 3 の配列を有する細胞株 DNA 中に、一塩基多型があるものを初めて見出した。また、くり返し数 2 (2R) のホモすなわち 2R/2R と 2R/3R ヘテロの 3 細胞株の 5-FU に対する IC<sub>50</sub> の分布は、2.8-17.5  $\mu\text{M}$ 、3R のホモすなわち 3R/3R の遺伝子型を有する 5 細胞株では、3.9-30  $\mu\text{M}$  であり、FUdR について同様のことを行うと、2R/2R および 2R/3R の 3 細胞株で 0.03-4.7  $\mu\text{M}$ 、3R/3R の 5 細胞株で 0.01-13  $\mu\text{M}$  であった。

35 種のヒト肝ミクロソーム及び 21 種の上清画分による EE2 の 2-水酸化、3-硫酸抱合及び 3-グルクロン酸抱合活性を検討したところ、平均値はそれぞれ 2.04、11.2 及び 1.20 pmol/min/mg protein であり、25、5.8 及び 24 倍の個体差が認められた。また、ヒト肝ミクロソームによる 2-水酸化活性において、CYP3A4 阻害剤である ketoconazole の影響を検討したところ、平均で 51.6%(最大値: 78.0%、最小値: 17.8%)阻害され、4.4 倍の個体差が認められた。

21 種の可溶性画分による procainamide の N-アセチル化活性を検討したところ、 $<1\sim 152$  pmol/min/mg protein の個体差が認められた。また、この活性は NAT2 の指標活性である sulfamethazine NAT2 活性と良好な相関性 ( $r^2: 0.756$ ) を示した。

#### 2) 薬物代謝酵素誘導の検索法について

ビーグルイヌに Rifampicin に投与したところ、ヒトと同様に肝 testosterone 6 $\beta$ 水酸化活性(6 $\beta$ -OHT)は顕著に上昇し、また Omeprazole 投与によって EROD 活性が著しい上昇を示した。これらの活性は、抗 CYP3A12 抗血清と抗 CYP1A2 抗血清で抑制されたことから、CYP3A12 と CYP1A1/2 の誘導によると結論された。これに対して、in vitro イヌ培養肝細胞系でのこれら薬物による CYP 誘導パターンの評価をしたところ、in vivo 投与時と同様に Rifampicin および Omeprazole によるそれぞれの活性の上昇が確認された。更に Omeprazole 処理によって ethoxyresorufin O-glucuronide の産生量が顕著に増加したことから、CYP1A1/2 のみならず UDPGT 活性も誘導されている可能性が強く示唆された。また、Rifampicin 投与によって肝 CYP3A12 の誘導がマーカー活性及び ELISA による酵素タンパク量が增加した。Clotrimazole 投与では、CYP2B11 と 3A12 の誘導が、 $\beta$ -NF、3-MC 及び Omeprazole 投与では、CYP1A1/2 の誘導が確認された。また、Rifampicin 投与によって肝 CYP3A12 mRNA 量が特異的に約 8 倍増加した。Clotrimazole 投与では CYP3A12 が約 2 倍、CYP2B11 が約 4 倍増加した。 $\beta$ -NF、3-MC 又は OMZ 投与によって CYP1A2 の発現量

が、それぞれ 9 倍, 8 倍, 15 倍増加し,  $\beta$ -NF 投与時のみに CYP1A1 の発現増加(約 5 倍)が認められた。

サル培養肝細胞においても rifampicin によりヒトと同様に 6 $\beta$ -OHT の上昇が認められ、CYP3A4 の誘導が生じた。また、CYP3A4 mRNA 濃度は Lanford 培地では 10  $\mu$ M から、HepatoZYME 培地では 1  $\mu$ M 以上の濃度で mRNA 濃度が増加した。omeprazole 処置では 50  $\mu$ M で CYP1A1/2 活性を誘導する傾向があることが読みとれたが、個体差が大きかった。

$\beta$ -ナフトフラボン(NF)および CS-722 添加による、ラットおよびサル培養肝細胞における *p*-ニトロフェノールグルクロン酸抱合活性の変化は、ラット肝細胞では、陽性対照物質である NF 曝露により *p*-ニトロフェノールグルクロン酸抱合活性が約 1.5 倍上昇した。また CS-722 曝露では 1 および 10  $\mu$ M の濃度で 1.6~1.7 倍の活性上昇が確認された。甲状腺肥大が確認されなかったサルの肝細胞では、活性の上昇は認められなかった。陽性対照物質の NF も誘導効果を示さず、サルは UGT1A の誘導を受けない動物種であることと示唆された。

ヒト CYP3A4 の遺伝子上流域とルシフェラーゼ遺伝子を挿入した組換えアデノウイルスを用いたレポーターアッセイ系を構築し、HepG2 細胞に本レポーター DNA を挿入し、ヒトにおいて CYP3A4 の誘導を起こすニフェジピン、トログリタゾン、デキサメサゾンにおいて応答性の認められるコロニーを単離した。in vivo 検索系の構築研究においては、アデノウイルスをレポーターベクター用い、CYP3A4 遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー (ER-6、DR-3 および mIE を含む) を有するレポーターコンストラクトを用いたマウス肝において、hPXR 発現によりリファンピシンは約 1000 倍近くの著しい転写活性化を示した。このことは in vitro で示されたリファンピシンによる誘導には mIE が重要性であるとの結果と一致した。一方、DR-3 を欠損させたレポーターコンストラクトでも、リファンピシンによる転写活性化は低下することより、in vivo における CYP3A4 遺伝子の転写活性化には少なくとも DR-3 および mIE を含む領域が必須であることが明らかとなった。

### 3) トランスポーターに関する研究

肝臓の有機アニオン系薬物の経細胞輸送モデルとして、極性を有する MDCK II 細胞に肝特異的な発現を示し広範な基質特異性を有する OATP2 を basal 側に、MRP2 を apical 側に発現した double-transfectant を用いて、17 $\beta$ -estradiol 17 $\beta$ -D-glucuronide(E<sub>2</sub>17 $\beta$ G), leukotriene C<sub>4</sub>, pravastatin および Cerivastatin (CER)の経細胞輸送を検討した結果、control 細胞や OATP2 や MRP2 の単独発現系ではみられず、basal から apical 方向への有意な方向性輸送が double transfectant においてのみ観察された。次いで、OATP2 単独発現系および double transfectant における経細胞輸送の定常状態 flux の飽和性を観察した結果、見かけ上 one-saturable one-nonsaturable な fitting ができることが分かった。トランスポーターを介した薬物間相互作用に関してラット遊離肝細胞への CER の取り込みに対する Cyclosporin A (CsA)の影響を見たところ、Ki=0.2  $\mu$ M で阻害することがわかった。同種の実験を凍結ヒト肝細胞を用いて行ったところ、ラットとほぼ同程度の阻害定数で、CsA が CER の取り込みを阻害することがわかった。

ヒト肝取り込み過程における各種トランスポーターの寄与率の評価系を構築する目的で、ヒト OATP2 および OATP8 を発現する HEK293 安定発現系を構築し、基質特異性や阻害実験の結果から、特異的基質や特異的阻害剤を探索を進めた結果、estrone-3-sulfate が、両者の間では、比較的 OATP2 特異的な基質であり、CCK-8(Cholecystokinin octapeptide)が、OATP8 特異的な基質になりうることを確認できた。

## 4. 考察・まとめ

### 4-1) 薬物代謝活性の個体差について

FT、5-DFUR は 5-FU のプロドラッグであり、主に、胃がん、大腸がんなどの消化器がんなどの治療に応用されてきたが、本薬の肝を中心とした代謝についての詳細は、十分には明らかにはされていなかった。本研究において、in vitro でのヒト肝ミクロソーム画分、ヒト肝上清画分いずれもが FT および 5-DFUR の代謝活性化に寄与し、5-FU を生成することが示された。また、いずれの画分においても代謝に個体差のあることが示された。また、EE2 の CLint においては 3-硫酸抱合反応が最も大きい値を示した。また、2-水酸化、3-硫酸抱合及び 3-グルクロン酸抱合活性に 6~25 倍の個体

差が観察された。この個体差はヒト血漿中濃度の個体差(10~15 倍)に匹敵していた。また、ヒト肝ミクロソームによる 2-水酸化活性に対する ketoconazole の阻害には 4.4 倍の個体差が認められ、2-水酸化反応における CYP3A4 の寄与においても個体差があることが示された。

5-FU の主要な作用点である TS をコードする *TYMS* 遺伝子の発現量に関連すると想定される 5-非翻訳領域のくり返し配列数 2, 3, 4, 5 回の多型が存在することが明らかになった。また、最も頻度が高いくり返し数 3 の配列中、1 塩基異なる異型対立遺伝子を初めて見出した。一方、固形癌由来の細胞について、その薬剤感受性、TS 酵素活性、*TYMS* 遺伝子型、前述のレポーターアッセイ系の結果を併せることまで行くと、TS およびその遺伝子多型と 5-FU に対する癌細胞の反応性の研究を、5-FU に対する薬剤反応性の個体差の予測に必要な基礎的研究は完結すると思われ、鋭意進めている。

Procainamide の主要な一次代謝経路である *N*-アセチル化及び加水分解反応に 152 倍以上の個体差が認められることを示した。また、この代謝に *NAT2* の寄与が大きいことを示唆した。

#### 4-2) 薬物代謝酵素誘導の評価系について

CYP3A4 誘導剤の化学構造の間には明確な相関関係は見られず、誘導メカニズムも完全には解明されていない。そこで *in vitro* の試験系として組換えアデノウイルスを用いたレポーターアッセイ系を構築し、恒常的に CYP3A4 誘導が検出可能な複数のクローンを単離した。これらは CYP3A4 誘導のスクリーニング系として使用可能と考えられた。リファンピシンによる CYP3A4 誘導に新たなシス-エレメント, major induction element of CYP3A4 (mIE)が必要であることを見出した。また、CYP3A4 誘導評価系を構築するためにはどのような遺伝子領域が必要であるかを *in vivo* において明らかにした。本研究結果から明らかになった CYP3A4 の誘導に必要な領域を用いることで、CYP3A4 誘導のより正確な評価系を *in vitro* および *in vivo* において構築することが可能になった。

Rifampicin による CYP3A 誘導と Omeprazole による CYP1A2 の誘導はヒトでは惹起されるものの、げっ歯類では発生せず CYP 誘導の種差の代表例とされてきたが、ビーグルイヌが *in vivo* 及び培養肝細胞系でヒトと同様の CYP 誘導パターンを示したことより、ヒト肝 CYP の誘導能評価予測動物種として有用であることを確認した。さらに mRNA の発現誘導面からの試験系として、TaqMan ケミストリーを用いた定量的 RT-PCR 法により高感度に CYP 誘導を検出することが出来た。

CS-722 がラット肝細胞においては *p*-ニトロフェノールグルクロン酸抱合活性を誘導するのに対してサル肝細胞では誘導せず、サルがヒトに近い応答を示すことを報告した。また、*p*-ニトロフェノールを基質とし、凍結肝細胞を用いた UGT1A 誘導評価系は、*in vivo* における甲状腺ホルモン代謝亢進を予測し得ると考えられた。また、サルの肝細胞はヒトにおける CYP3A4 誘導を予測する上で有用なツールになり得ると考えられたが使用する培地により誘導倍率には違いが認められた。

#### 4-3) 膜輸送系について

極性を有する MDCK II 細胞を用いて、肝特異的な発現を示し広範な基質特異性を有する OATP2 を basal 側に、MRP2 を apical 側に発現した double-transfectant を構築し、種々の有機アニオン化合物の経細胞輸送の検討を行った結果、basal から apical 方向への有意な方向性輸送が double transfectant においてのみ観察され、ヒト肝臓における経細胞輸送を定性的に反映する系として有用であることを示した。また、OATP2 単独発現系および double transfectant における経細胞輸送の定常状態 flux の飽和性を観察した結果、*in vitro* 実験で得られた結果から、*in vivo* での阻害を定量的に説明することが可能であった。同種の実験を凍結ヒト肝細胞を用いて行ったところ、ラットとほぼ同程度の阻害定数で、CsA が CER の取り込みを阻害することがわかり、ヒトにおける薬物間相互作用についても、肝への取り込み過程での阻害が原因の一つである可能性が示唆された。

セリバスタチンのヒト肝細胞への取り込みのシクロスポリンによる阻害定数はシクロスポリンの循環血中での蛋白非結合型濃度と比べると高いものであったが、経口投与されたシクロスポリンが門脈を経て肝臓に流入するために肝臓に暴露される血中濃度が循環血中に比べて高くなることを考慮した場合には、相互作用が生じる可能性があると考えられる。この少なくとも一部には肝血管側に発現するトランスポーター OATP2 を介した肝取り込み過程で生じていることが示唆された。

ヒト OATP2 および OATP8 を発現する HEK293 安定発現系を用い、特異的基質の取り込みをヒト凍結肝細胞での取り込みとを相対的に比較することで、肝細胞における両トランスポーターの寄与率を RAF(relative activity factor)法などを適用することで評価できると考えている。

なお、大日本製薬の協力研究者である橋爪博士は小腸における新 P450 (CYP2J2 と CYP4F12)に関する研究が認められ、薬物動態学会奨励賞を受賞した。

## 5. 研究発表

- 1) Ishida S, Shigemoto-Mogami Y, Kagechika H, Shudo K, Ozawa S, Sawada J, Ohno, Y., Inoue K. Clinically potential subclasses of retinoid synergists revealed by gene expression profiling. *Mol Cancer Ther.*, 2, 49-58 (2003)
- 2) Murayama, N., Nakamura, T., Saeki M., Soyama, A., Saito Y., Sai, K., Ishida. S., Nakajima O, Itoda, M., Ohno, Y., Ozawa, S., Sawada, J.: CYP3A4 gene polymorphisms influence testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation. *Drug Metabol, Pharmacokin.* 17, 150-156 (2002)
- 3) Ozawa S, Hamada M, Murayama N, Nakajima Y, Kaniwa N, Matsumoto Y, Fukuoka M, Sawada J, Ohno, Y. Cytosolic and microsomal activation of doxifluridine and tegafur to produce 5-fluorouracil in human liver. *Cancer Chemother Pharmacol.* 50, 454-458 (2002)
- 4) Sakemi K, Ito R, Umemura T, Ohno, Y., Tsuda M. Comparative toxicokinetic/toxicodynamic study of rubber antioxidants, 2-mercaptobenzimidazole and its methyl substituted derivatives, by repeated oral administration in rats. *Arch Toxicol.* 76, 682-91 (2002)
- 5) Ozawa S, Katoh T, Inatomi H, Imai H, Kuroda Y, Ichiba M, Ohno, Y., Association of genotypes of carcinogen-activating enzymes, phenol sulfotransferase SULT1A1 (ST1A3) and arylamine N-acetyltransferase NAT2, with urothelial cancer in a Japanese population. *Int J Cancer.* 102, 418-421 (2002)
- 6) Ishida S, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Ando M, Ohno, Y., Ozawa S, Sawada J. Characterization of human CYP1A1/1A2 induction by DNA microarray and alpha-naphthoflavone. *Biochem Biophys Res Commun.* 296, 172-177 (2002)
- 7) Kurebayashi H, Harada R, Stewart RK, Numata H, Ohno, Y., Disposition of a low dose of bisphenol A in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci.* 68, 32-42 (2002)
- 8) Murayama, N., Sai, K., Nakajima, Y., Kaniwa, N., Ozawa, S., Ohno, Y., Sawada J. Expression of CYP2A6 in tumor cells augments cellular sensitivity to tegafur. *Jpn. J. Cancer Res.* 92, 524-528 (2001)
- 9) Hikima, T., Ohno, Y., Maibach HI: Metabolism of prednisolone 21-acetate in hairless mouse skin. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14, 203-209 (2001)
- 10) S. Matsumoto, T. Hiramata, T. Matsubara, K. Nagata and Y. Yamazoe. Involvement of CYP2J2 on the intestinal first-pass metabolism of antihistamine drug, astemizole. *Drug Metab. Dispos.*, 30, 1240-1245 (2002)
- 11) M. Ogino, K. Nagata and Y. Yamazoe. Selective suppression of human CYP3A form, CYP3A7, by troglitazone in HepG2 cells. *Drug Metab. Pharmacokin.*, 17, 42-46 (2002)
- 12) Y. Kamiyama, A. Sato, W. Honma, K. Nagata and Y. Yamazoe. A hydroxysteroid sulfotransferase, St2b2, in a skin cholesterol sulfotransferase in mice. *M. Shimada, J. Biochem.*, 131, 167-169 (2002)
- 13) W. Homma, M. Shimada, H. Sasano, S. Ozawa, M. Miyata, K. Nagata and Y. Yamazoe. Phenol sulfotransferase, ST1A3, as the main enzyme catalyzing sulfation of troglitazone in human liver. *Drug Metab. Dispos.*, 30, 944-949 (2002)
- 14) M. Miyata, K. Motoki, E. Tamura, M. Furukawa, F. J. Gonzalez and Y. Yamazoe. Relative importance of maternal and embryonic microsomal epoxide hydrolase in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced developmental toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, 63: 1077-1084 (2002)
- 15) M. Miyata, E. Tamura and Y. Yamazoe. Development of an in vitro system detecting

- pro-embryotoxin. *Jpn. J. Pharmacol.*, 89: 320-323 (2002)
- 16) M. Furukawa, T. Okubo, M. Ogino, T. Yamazaki, M. Shimada, K. Nagata and Y. Yamazoe. Adenovirus vector-mediated reporter system for in vivo analysis of the human CYP3A4 gene activation. *J. Biochem.*, 131, 71-78 (2002)
- 17) 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)
- 18) Shitara, Y., Sugiyama, D., Kusuhara, H., Kato, Y., Abe, T., Meier, P.J., Itoh, T. and Sugiyama, Y., Comparative inhibitory effects of different compounds on rat Oatp1 (slc21a1) and Oatp2 (slc21a5)-mediated transport. *Pharm. Res.* 19, 147-53 (2002)
- 19) Sugiyama, D., Kusuhara, H., Shitara, Y., Abe, T. and Sugiyama, Y., Effect of 17 $\beta$  estradiol-D-17 $\beta$ -glucuronide (E217 $\beta$ G) on the rat organic anion transporting polypeptide 2 (rOatp2)-mediated transport differs depending on substrates. *Drug Metab. Dispos.* 30, 220-3 (2002)
- 20) Sasaki, M., Suzuki, H., Ito, K., Abe, T. and Sugiyama, Y., Transcellular transport of organic anions across double-transfected MDCK II cell monolayer expressing both human organic anion transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *J. Biol. Chem.* 277, 6497-6503 (2002)
- 21) Kusuhara, H. and Sugiyama, Y., Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, kidney and brain. *J. Control. Rel.* 78, 43-54 (2002)
- 22) Ueda, K., Kato, Y., Komatsu, K. and Sugiyama, Y., Inhibition of the biliary excretion of methotrexate by probenecid in rats: Quantitative prediction of the interaction from in vitro data. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 1036-1043 (2001)
- 23) Han, Y-H., Kato, Y., Haramura, M., Ohta, M., Matsuoka, H. and Sugiyama, Y., Physicochemical parameters responsible for the affinity of methotrexate analogs for rat canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *Pharm. Res.* 18, 579-586 (2001)
- 24) Sugiyama, D., Kusuhara, H., Shitara, Y., Abe, T., Meier, P. J., Sekine, T., Endou, H., Suzuki, H. and Sugiyama, Y., Characterization of the efflux transport of estradiol 17 $\beta$ -D-glucuronide from the brain across the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 316-322 (2001)
- 25) Morita, N., Kusuhara, H., Sekine, T., Endou, H. and Sugiyama, Y., Functional characterization of rat organic anion transporter 2 in LLC-PK1 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1179-1184 (2001)
- 26) Kusuhara, H. and Sugiyama, Y., Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (Part 1,2). *Drug Discov. Today* 6, 150-156(1), 206-212 (2) (2001)
- 27) Kusuhara, H. and Sugiyama, Y., Drug-drug interactions involving the membrane transport process. In: "Drug-Drug Interactions" Ed. by A.D. Rodrigues. pp.123-188, 2001, Marcel Dekker, New York.

## 6. 知的所有権の取得状況

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