

免疫抑制剤の体内動態並びに薬効発現に関わる蛋白群の遺伝子解析を基盤とした移植臓器における拒絶反応防御に関する研究

所 属 京都大学医学部附属病院 薬剤部
研究者 乾 賢一

分担研究者

- | | |
|--------------------------|----------------|
| (1) 京都大学医学部附属病院薬剤部 | 齋藤秀之、矢野育子、増田智先 |
| (2) 京都大学医学部附属病院臓器移植医療部 | 田中紘一、木内哲也 |
| (3) 国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部 | 辻本豪三、田上昭人 |
| (4) 藤沢薬品工業株式会社薬物動態研究所 | 加賀山 彰 |

要 旨w

生体肝移植後の拒絶反応防御と免疫抑制剤タクロリムスの適正使用法確立を目的として、術時の小腸P-糖蛋白質発現量に基づくタクロリムス初期投与量設定とマイクロアレイによる網羅的な拒絶反応関連遺伝子の探索を行った結果、本タクロリムス投与設計法の有用性と拒絶反応関連遺伝子群の絞込に成功した。

1. 研究目的

我が国における移植医療は、世界的にも高い評価を得ている生体肝移植や徐々に症例数を重ねている脳死ドナーからの臓器移植など医療の一端として着実に定着しつつある。我々は京都大学医学部附属病院での生体肝移植治療において、免疫抑制剤タクロリムス(FK-506)の血中濃度モニタリングに携わり、これまで890例を越える術後管理を行ってきた。また、生体肝移植患者小腸粘膜に発現する薬物輸送体P-糖蛋白質の発現量が、術後初期のタクロリムス体内動態に重要であることを明らかにしてきた。生体肝移植後の拒絶反応発現は、患者の予後に関わる重要な問題であるが、タクロリムスに対する応答性を含めた拒絶反応の支配因子については不明点が多い。従って、患者一人ひとりに対する適切な有効治療域の設定は、拒絶反応と予期せぬ副作用の発現を未然に防止できる。

このような背景と問題点を踏まえて生体肝移植患者におけるタクロリムス投与方法確立(適切な有効治療域の設定と投与設計法の確立)を最終目標とし、次の研究計画を実施した。1) 生体肝移植手術時の小腸・移植肝組織片を用い、患者個々の小腸・肝臓P-糖蛋白質及びCYP3A4発現量を定量的に解析し、得られた結果とタクロリムス体内動態との比較解析を行った。特に、小腸MDR1 mRNA発現とタクロリムス体内動態との比較解析についてはプロスペクティブな評価を行った。2) MDR1遺伝子について、既に知られている部位を中心に多型解析を行い表現型との比較解析を行った。3) 患者の全血由来のtotal RNA画分を抽出し、タクロリムスの体内動態並びに薬理効果発現に関わる諸遺伝子群の発現レベルを定量数値化し術後経過との比較を行った。4) 生体部分肝移植術後の移植肝再生時のモデル動物として、2/3肝摘出ラットを作成しタクロリムス体内動態の肝再生に伴う変動について速度論的解析を行った。5) 生体肝移植患者由来の臨床検体を用い、タクロリムスの未変化体及び代謝物のLC/MS/MSを用いた高感度検出法の開発と代謝物のプロファイリング、6) 臓器別標準化cDNAライブラリーの作成とそれに基づく臓器別標準化cDNAマイクロアレイの作成、及び患者検体を用いた発現解析を行った。

2. 研究方法

(1) ヒト組織の採取とtotal RNA画分の抽出、P-糖蛋白質およびCYP3A4の定量

生体肝移植手術の胆管再建時に切除される小腸組織を試料として用いた。粘膜部分を剥離した後にtotal RNA画分を抽出した。また、術時の肝生検組織を用いて小腸組織と同様にtotal RNA画分の抽出を

行った。リアルタイム PCR による MDR1 mRNA および CYP3A4 mRNA の定量数値化を行った。

(2) ヒト全血由来の total RNA 画分を用いた各種タクロリムス薬理効果発現に関わる遺伝子群の定量
臓器移植と拒絶反応並びに免疫抑制剤の薬理効果発現に関わる遺伝子群 (約 120 種類) について、それぞれに特異的な反応条件と標準遺伝子を作成し、リアルタイム PCR 法での定量数値化を行った。

(3) 生体肝移植患者におけるタクロリムス代謝能の評価

日々の薬物血中濃度モニタリングのために採取された末梢血 (約 2mL) の余剰分を、胆汁検体については 24 時間あたりの胆汁流量を測定した後に廃棄されるものの一部を取り分け、京都大学医学部附属病院内において前処理を行い、藤沢薬品工業 (株) 薬物動態研究所での LC/MS/MS 測定を行った。定量限界はそれぞれ試料中濃度として 0.5ng/mL であった。

(5) 2/3 肝摘ラットの作成とタクロリムス体内動態の経時的な解析

定法に従い、Wistar 系雄性ラットの肝臓 2/3 をエーテル麻酔下で摘出した。術後、経時的にタクロリムスの各種動態パラメータを求めた。

(6) 臓器別標準化 cDNA マイクロアレイの作成と IgA 腎症モデルマウスの解析及びヒト末梢血 total RNA における拒絶反応関連遺伝子の探索

サブトラクション法を応用し、約 5,000 遺伝子を用いたグラスアレイの作成を行った。このようにして作成した内の腎臓標準化 cDNA マイクロアレイを用いて、IgA 腎症モデルマウスである HIGA マウスの遺伝子発現解析を行った。これらの技術を応用して、生体肝移植患者末梢血由来の total RNA を用い、マイクロアレイ解析による拒絶反応関連遺伝子の探索を行った。

3. 研究成果

(1) 生体肝移植患者の小腸組織における P-糖蛋白質及び CYP3A4 の定量とタクロリムス体内動態との比較解析

我々はこれまで、生体肝移植患者の小腸 P-糖蛋白質発現量は術後初期のタクロリムス血中濃度/経口投与量 (C/D) 比と良好な負の相関を示すことを明らかにしてきた。生体肝移植患者に対するタクロリムス治療は、移植後一日目の夕刻より経口投与で開始される。すなわち、術時検体を受け取った後タクロリムスの投与量を設定するまでに、小腸 P-糖蛋白質の発現量が定量数値化されれば、得られたデータをタクロリムス初期投与量設定のための指標として臨床に還元することが可能となる。本研究における術時検体を受け取った後の RNA 抽出と逆転写、リアルタイム PCR による解析に要する時間は、最速約 6 時間、平均 8 時間程度であり、移植後一日目夜からのタクロリムス経口投与開始に十分間に合うことが分かった。

次に、本解析系により求められた小腸 MDR1 mRNA レベルのタクロリムス初期投与量設定に対する有用性について介入試験を行った。すなわち、術時に胆管再建のための小腸組織切除を行う症例を介入例、小腸切除を行わず胆管-胆管吻合による胆管再建を行う症例 (小腸組織の切除は行わない) を非介入例として、術時小腸 MDR1 mRNA 発現レベルに基づくタクロリムスの初期投与量設定と術後 7 日間の血中濃度推移の比較解析を試みた。介入例 35 例と非介入例 29 例の術後初期におけるタクロリムストラフレベルの推移を調べた結果、介入例におけるタクロリムスの血中濃度推移は総じて初期目標 10ng/mL 近辺であり良好にコントロールされること、非介入例で認められた術後 2 及び 3 日目の 5ng/mL 程度という低血中濃度並びに目標域 (10~15ng/mL) を大きく上回る 20ng/mL 以上の血中濃度は介入例では認められなかった (Fig. 1)。術後初期における拒絶反応は、術直後 10 日間におけるタクロリムスの低血中濃度 (10ng/mL 未満) と相関することから、本介入試験で得られた結果は小腸 MDR1 mRNA 発現レベルに応じたタクロリムスの初期投与量設定、すなわち生体肝移植患者におけるタクロリムスのテーラーメイド医療の一旦を提供することができ、術直後の急性拒絶反応発現の予防に貢献できることが示唆された。さらに、小腸 P-糖蛋白質発現量は術直後タクロリムス C/D 比と良好な逆相関を示すことが過去の症例を含め計 78 例で確認され、我々が提唱してきた小腸 MDR1 mRNA 発現レベルの移植直後のタクロリムス体内動態に対する予測因子としての妥当性が示された。今後、さらに症例数を積み重ね、臨床応用を念頭に本研究結果の客観的な妥当性について明らかにしていく予定である。

(2) MDR1 遺伝子多型解析

MDR1 遺伝子において既に存在が明らかとなっている一塩基多型 (SNP) を中心に解析を行った。そ

の結果、それぞれのアレル頻度についてはこれまで日本人において解析されたデータと類似するものであった。我々は、生体肝移植患者においてMDR1 C3435T多型は小腸P-糖蛋白質の発現量やタクロリムス体内動態との相関を示さないこと、小腸CYP3A4発現量と有意な相関関係を示すことを明らかにした。

(3) 拒絶反応発現・タクロリムス薬理効果発現に関わる遺伝子群の探索

移植直後の拒絶反応が頻発すると考えられるPOD3～POD10に着目し、それら蛋白質をコードするmRNA発現量の定量と臨床所見との比較解析を試みた。その結果、いくつかの遺伝子について拒絶反応発現との相関を示す傾向が認められた。また、P-糖蛋白質やCYP3Aをコードする遺伝子の末梢白血球における発現を確認すると共に、患者間における大きな個体間変動を明らかにすることができた。

(4) 生体肝移植患者におけるタクロリムス代謝能の高感度評価法の開発と患者検体への応用

生体肝移植患者の特に術後初期においては、血中胆汁酸量、コレステロール量、ビリルビン値などが総じて高く、同じ血液でも粘性が極めて高い。また、胆汁についても蛋白を含む場合があり一般的な抽出・前処理が困難である。さらに、*in vitro*のレベルにおいて、知られているタクロリムスの代謝物は現在8種類あり、代謝物それぞれの生成速度と臨床的各症状との対応については全く知られていない。本研究では、日本人生体肝移植患者由来の臨床検体を用いて、タクロリムスの未変化体並びに代謝物の高感度定量法の開発を試みた。ヒト血液検体並びに胆汁検体におけるタクロリムスの未変化体及び代謝物の定量を行った結果、ある患者では代謝物が検出されなかったのに対し、ある患者ではM1、M2、M3の3種類の代謝物が検出された(Fig. 2)。また、LC/MS/MSで得られた全血中濃度の結果は、採血当日に測定しているIMx(アボット社)により得られた結果とほぼ対応するものであった。さらに、IMxにおける検出限界(2ng/mL)を考え併せると、我々が開発したヒト臨床検体中のタクロリムス濃度測定法は、検出感度が高いため(検出限界:0.5ng/mL以下)一般的に分布量が低いと考えられている白血球中のタクロリムス濃度の測定も可能と考えられた。予試験的に測定したところ、白血球中のタクロリムス濃度は全血中濃度と比較して2%～50%と大きくばらつくことが判明した。

次に、臨床において主要と考えられるM1～M3に着目し、日々のタクロリムス血中濃度測定用患者検体の余剰分を用いて全血中におけるタクロリムス代謝物プロファイルの作成を試みた。約60症例・1,500検体を上回る全血中未変化体タクロリムス並びにM1～M3の代謝物のLC/MS/MSによる経日的な定量を行った。その結果、患者間における主代謝物は様々であること、それぞれの代謝物量は未変化体タクロリムス濃度に相関しないことが認められた(Fig. 3)。

(5) モデル動物を用いた解析

2/3肝摘出ラットを用い、切除後経時的にタクロリムスの体内動態について詳細な解析を行った。その結果、2/3肝摘出後早期(～2日迄)では、タクロリムスの肝クリアランスは著明な低下を示し、残存肝重量との相関性を示さなかった。一方、2/3肝摘出4日以降では、肝重量の回復に伴うタクロリムスクリアランスの上昇(回復)が認められ、摘出14日以降では模擬処置群と変わらないレベルにまでタクロリムスのクリアランス速度は回復していた。同時に経口投与されたタクロリムスの小腸における代謝・消失速度の変動について調べたところ、観察期間を通じてほぼ一定であった。以上の結果は、2/3肝摘出後早期においては、CYP3A活性が顕著に低下すること、回復期においては肝組織重量の回復に従ったクリアランスの回復すなわち単位肝重量あたりのCYP3A活性は維持されることを示すものである。さらに、P-糖蛋白質は肝胆管側膜に発現することが知られている。ラット2/3肝摘出ラットにおいて、肝P-糖蛋白質は一過性の発現亢進を示したが、タクロリムスの胆汁排泄速度に対しほとんど影響しなかった。

(6) 臓器別標準化cDNAマイクロアレイの作成とIgA腎症モデルマウスの解析

腎標準化ライブラリーより、任意に4,224クローンを選択し、マイクロアレイを作成した。様々な遺伝子をランダムにスポットしたマイクロアレイでは、解析可能なシグナル強度が得られないスポットが多数存在していたが、本研究において我々が作成した標準化cDNAマイクロアレイでは、80%以上のスポットにおいて、解析可能なシグナル強度が確保できた。

そこで、IgA腎症モデルマウスであるHIGAマウスの遺伝子発現解析を行った。その結果、組織学的に腎病変が観察されない生後6週齢のマウスにおいて、多くの遺伝子発現に変動が認められた。一方、組織学的にIgA腎症と診断される25週齢のHIGAマウス腎mRNA発現量は、6週齢で認められたほどには発現変動を示さないことも明らかとなった。変動が認められた遺伝子の中にはPDGFなどヒトIgA腎症に

において発現更新する遺伝子や、メサンギウム細胞の増殖に関わる遺伝子なども存在した。

(7) 生体肝移植患者末梢血 RNA を用いた拒絶反応関連遺伝子の探索

マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析とリアルタイム PCR 法を用いた遺伝子発現の定量数値化を組み合わせ、移植肝に対する拒絶反応関連遺伝子の探索を行った。本研究では、危険性の観点から生検採取が困難な術後 10 日以内における拒絶反応発症例に焦点を当て、本研究成果の将来的な臨床応用を念頭に解析を実施した。また、対象症例は患者背景等による影響を最小限に押さえるため、ABO 適合移植症例であること、原疾患は胆道閉鎖症であること並びに患者の術時年齢を 3 歳以下とすることなどの Criteria を設けた。既知及び未知 EST を含む 39,000 種類の遺伝子を解析対象として、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った結果、臨床的に拒絶と診断された日の前日に発現の上昇が認められた遺伝子は約 200 種類に絞られた。一方、拒絶反応の前日に低下すると判断された遺伝子数は 5 種類のみであった。さらに、タクロリムスの薬理作用機序及び移植免疫に関わると考えられる遺伝子について、順次リアルタイム PCR による定量解析を進めた結果、一部の遺伝子について拒絶反応前日に上昇することが見出された。便宜的に本解析によって絞られた遺伝子群を G とすると、この遺伝子群 G の発現は先のマイクロアレイでの結果でも拒絶反応の発現前日に亢進することが示された遺伝子群と一部対応していた。

4. 考察

先ず、術時検体を用いた小腸 P-糖蛋白質発現量の定量とそれに基づくタクロリムス初期投与量設定については、検体中の RNA 抽出から mRNA 発現量定量数値化までの所要時間が十分短縮され、移植直後のタクロリムス投与量設定に十分利用可能であることが示唆された。介入試験の結果、術時小腸 MDR1 発現レベルを指標としたタクロリムスの初期投与量設定は、術後の安定したタクロリムスの血中濃度をもたらすこと、標的有効域を大幅に下回る/上回る症例を認めなかったことから、タクロリムスの血中濃度コントロール不備による副作用発現の回避が可能と考えられた。さらに、小腸 MDR1 mRNA 発現レベルの移植直後のタクロリムス体内動態に対する重要性も確認され、本研究成果の臨床的有用性が示唆された。

本研究において、我々は MDR1 C3435T 多型が CYP3A4 発現量と良好に相関するという結果を得た。タクロリムス治療のための必要用量における民族差等を考慮すると、タクロリムスなど主に肝 CYP3A4 を介して代謝消失を受ける薬物については、その代謝消失には大きな民族差が存在し、MDR1 遺伝子の C3435T 変異と強く連鎖する可能性が示唆された。今後、MDR1 C3435T 多型でグループ分けし、網羅的な遺伝子多型解析を行うことによって未知 CYP3A4 遺伝子多型の発見に繋がると期待される。

生体肝移植患者由来の臨床検体を用いたタクロリムスの血液中分布特性について、タクロリムスの未変化体及び代謝物の LC/MS/MS を用いた高感度検出法の開発を行った。その結果、LC/MS/MS で得られた未変化体血中濃度の結果は、IMx で測定している日々のタクロリムス血中濃度と対応したものであり、測定法の違いによる誤差は小さいと考えられた。また、LC/MS/MS による検出法が、IMx よりも高感度であることから、微量検体の場合や分布の程度が低いと考えられている血漿・白血球中の測定にも適用可能と考えた。さらに、血中における代謝物のプロファイリングを行ったところ、主代謝物が M1、M2 または M3 等のように患者間での大きな差違が見出された。現在臨床で用いられているタクロリムスアッセイキット（アボット社、IMx タクロリムス II）は、未変化体タクロリムスの他に活性代謝物である M2 や不活化代謝物 M3 を誤認識する。M2 については薬理効果を有するタクロリムス代謝物として評価可能であるが、副作用については未知である。また、M3 を多く生成する患者においては、タクロリムスの見かけ上の血中濃度を高く設定する必要がある。従って、本法を用いて血中 M3 の有無を調べることは、タクロリムス血中濃度の過大評価修正に役立つと想定される。一方、胆汁中 M2 濃度が M1 や M3 と比して高濃度である症例では、有効血中濃度を高く設定することで拒絶反応を予防できるという臨床結果が得られ、移植肝によるタクロリムスの代謝活性は異物解毒の観点のみならず有効域設定の個別化にも関わることが推察された。さらに、胆汁中代謝物濃度がある臨床症状と密接な関わりがあるという予備的な結果も得ていることから、今後解析症例をさらに積み重ね、タクロリムス未変化体並びに代謝物の体内動態を詳細に解析し、臨床症状との関係について明らかにしていく予定である。

我々はこれまで、生体肝移植患者におけるタクロリムス消失速度、すなわち肝グリアランスは術後日数の経過に従い増大することを明らかにした。しかしながら、移植直後においてはタクロリムスの体内動態

は肝クリアランスよりもむしろ小腸 P-糖蛋白質発現量と良好に逆相関することを見出している。本研究において 2/3 肝摘出後のラットにおけるタクロリムスクリアランスは、肝組織の再生が開始されるまで低値を示した状態を推移していた。これらの結果は、タクロリムスの肝クリアランスが術後早期と肝再生期において異なるという臨床での現象と対応するものであった。さらに、切除後の再生に伴う肝 P-糖蛋白質発現亢進とタクロリム胆汁中分泌速度低下との間に相関は見出せなかった。従って、P-糖蛋白質の細胞内局在と in vivo 寄与率も含めた解析が必要であると考えられた。本モデルラットは、移植直後のタクロリムスの体内動態変動を調べる上で有用なツールになり得ることから、今後移植肝の再生期におけるタクロリムス体内動態について詳細な解析を進め、臨床への還元を目指すものである。

本研究において作成した標準化 cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析は、80%以上という高い確率でシグナル強度の定量数値化を可能とした。この中で、腎標準化マイクロアレイを用いた IgA 腎症モデルマウスの mRNA 発現解析の結果から、HIGA マウス腎 mRNA 発現プロファイルの変化が組織学的な腎症の発症と進展よりも速く認められることが判明した。従って、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析は、病態時における遺伝子発現変化を調べられるだけでなく、病変発症の予知という観点からも応用性が高いことが示唆された。

また、約 39,000 種類の遺伝子を解析対象として拒絶反応関連遺伝子の網羅的探索を行った結果、約 200 種類の拒絶反応関連遺伝子の抽出に成功した。各遺伝子特異的なリアルタイム PCR の結果からも陽性と判断された遺伝子と一部対応するものが見出されたことから、本遺伝子群の生理的・病態生理学的意義について詳細な解析を進めることにより、拒絶反応の予測と早期対応が可能になると考えられる。現在、生体肝移植患者における臨床的拒絶反応（ステロイドパルス療法施行例）の内、単なる移植肝の機能障害である場合が少なくない。実際には、生検採取による組織学的な診断を待たねばならず、ステロイドパルス療法の先行実施に踏み切らざるを得ない場合が多い。従って、本研究で見出された遺伝子群の拒絶反応予測因子としての有用性が確立されれば、過量のステロイド負荷を行わずに済み、過剰免疫抑制の回避とそれによる感染症を未然に防ぐことが可能になるであろう。

5. まとめ

当初の到達目標である臓器移植患者における拒絶反応防御法確立に向けた、研究技術基盤の開発並びにその実施と解析症例数の積み重ねについて概ね達成することができた。すなわち、京都大学医学部附属病院移植外科による末期肝不全患者に対する生体部分肝移植治療の実施、京都大学医学部附属病院薬剤部による術後管理並びに術時検体（小腸・肝臓組織）を用いた免疫抑制剤タクロリムス体内動態関連遺伝子の発現定量とその臨床応用、血液検体を用いたタクロリムス薬理効果関連遺伝子群の発現定量、藤沢薬品工業薬物動態研究所による血液中タクロリムス及びその代謝物の定量数値化を目指した高感度定量法の開発と患者検体を用いた定量解析・代謝物プロファイリング、国立成育医療センター研究所による網羅的な遺伝子発現解析のための標準化 cDNA マイクロアレイ作成と生体肝移植患者の末梢血 RNA を用いた網羅的遺伝子発現解析、京都大学医学部附属病院と国立成育医療センター研究所の連携による生体肝移植後の拒絶反応関連遺伝子群の探索と絞り込みという広範囲且つ詳細な研究計画を実施した。最終年度では、生体肝移植患者における拒絶反応関連遺伝子群の特定と臨床応用を目指し、解析症例並びに解析対象疾患等を積み重ねる予定である。

本研究目標の達成によって、臓器移植患者における有効かつ安全な免疫抑制剤の使用法確立並びに拒絶反応の予測とその防御のための貴重な基礎情報が得られるものとする。

6. 研究発表

1. Masuda, S., Uemoto, S., Goto, M., Fujimoto, Y., Tanaka, K., and Inui, K., Interventional effects of mucosal MDR1 mRNA monitoring for tacrolimus therapy after small bowel transplantation, submitted
2. Masuda, S., Goto, M., Kiuchi, T., Uemoto, S., Kodawara, T., Saito, H., Tanaka, K., and Inui, K., Enhanced expression of enterocyte P-glycoprotein depresses cyclosporine bioavailability in a recipient of living-donor liver transplantation., submitted

3. Goto, M., Masuda, S., Saito, H., and Inui, K., Decreased expression of P-glycoprotein during differentiation in the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem Pharmacol* (2003) **in press**
4. Fukudo, M., Yano, I., Fukatsu, S., Saito, H., Uemoto, S., Kiuchi, T., Tanaka, K., and Inui, K., Forecasting of blood tacrolimus concentrations based on the Bayesian method in adult patients receiving living-donor liver transplantation. *Clin Pharmacokinet* (2003) **in press**
5. 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* (2002) 12(6)451-457.
6. 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 Sug Res*, (2002) 103(2): 215-222.
7. 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*, (2002) 300(3): 1063-1069.
8. Jiko, M., Yano, I., Wakasugi, H., Saito, H., and Inui, K., Evaluation of pharmacokinetic interaction between cyclosporin A and probucol in rats. *Pharm Res* (2002) 19 (9) 1362-1367.
9. 増田智先, 乾 賢一: 薬物動態における薬物トランスポーターの分子機構 (特集: ゲノム世紀の創薬開発研究と薬物療法). *日本臨床*, (2002) 60(1): 65-73 [総説].
10. 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*, (2002) 54(1): 65-70.
11. 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* (2001) 69(5), 308-316.
12. 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*, (2001) 57(6-7), 479-484.
13. 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*, (2001) 99(2), 294-300.
14. 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*, (2001) 18(5), 713-717.
15. 橋田 亨, 乾 賢一: 免疫抑制剤の血中濃度モニタリング: 臓器移植後のモニタリングと臨床検査. *臨床病理*, (2001) 49(7), 662-664.
16. Hiroyuki Yasui, Kazuko Deo, Yuko Ogura, Hiromi Yoshida, Toshifumi Shiraga, Akira Kagayama, and Hiromu Sakurai.: Evidence for singlet oxygen involvement in rat and human cytochrome P450-dependent substrate oxidations. *Drug Metabol Pharmacokin*, (2002) 17, 416-426.
17. T. Niwa, A. Kagayama, K. Kishimoto, Y. Yabusaki, F. Ishibashi, and M. Katagiri.: Amino acid residues affecting the activities of human cytochrome P450 2C9 and 2C19. (2002) *Drug Metab Dispos*, 30, 931-936.
18. Yoichi Naritomi, Shigeyuki Terashita, Sumihisa Kimura, Akira Suzuki, Akira Kagayama and Yuichi Sugiyama.: Prediction of human hepatic clearance from *in vivo* animal experiments and *in vitro* metabolic studies with liver microsomes from animals and humans. (2001) *Drug Metabolism and Disposition*, 29, 1316-1324.
19. 池田敏彦, 西村憲治, 谷口朋義, 吉村勉, 秦武久, 櫻山英二, 工藤庄次, 宮本剛八郎, 小林弘幸, 小

林智, 岡崎治, 伯水英夫, 青山英嗣, 吉村義信, 山田泰弘, 吉川正美, 大塚峯三, 丹羽俊朗, 加賀山彰, 鈴木聡, 佐藤哲男: 酵素阻害に起因する薬物相互作用のインビトロ評価—HABプロトコール—薬物動態, (2001) 16, 115-126.

20. Katsuma, S., Shiojima, S., Hirasawa, A., Suzuki, Y., Takagaki, K., Murai, M., Kaminishi, Y., Hada, Y., Koba, M., Muso, E., Miyawaki, S., Ohgi, T., Yano, J., and Tsujimoto, G., Genomic analysis of a mouse model of immunoglobulin A nephropathy reveals an enhanced PDGF-EDG5 cascade. *Pharmacogenomics J* (2001) 1 (3): 211-217.
21. Katsuma, S., and Tsujimoto, G., Genome medicine promised by microarray technology. *Expert Rev Mol Diagn* (2001) 1 (4): 377-382.
22. Tsujimoto, G., Katsuma, S., Shiojima, S., Hirasawa, A., and Tanoue, A., Functional genomic research of alpha1-adrenoceptors. *J Cardiovasc Pharmacol* (2001) 38 Suppl 1 S1-5.
23. Awaji, T., Hirasawa, A., Shirakawa, H., Tsujimoto, G., and Miyazaki, S., Novel green fluorescent protein-based ratiometric indicators for monitoring pH in defined intracellular microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) 289 (2): 457-462.
24. Yamauchi, J., Itoh, H., Shinoura, H., Miyamoto, Y., Tsumaya, K., Hirasawa, A., Kaziro, Y., and Tsujimoto, G., Galphaq-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase 4/c-Jun N-terminal kinase cascade. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) 288 (5): 1087-1094.
25. Katsuma, S., Nishi, K., Tanigawara, K., Ikawa, H., Shiojima, S., Takagaki, K., Kaminishi, Y., Suzuki, Y., Hirasawa, A., Ohgi, T., Yano, J., Murakami, Y., and Tsujimoto, G., Molecular monitoring of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by cDNA microarray-based gene expression profiling. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) 288 (4): 747-751.
26. Homma, N., Tsujimoto, G., and Hashimoto, K., Electrophysiologic effects of an antiarrhythmic agent, bidisomide, on sodium current in isolated rat ventricular myocytes: comparison with mexiletine and disopyramide. *Jpn J Pharmacol* (2001) 86 (1): 23-31.
27. Yamauchi, J., Hirasawa, A., Miyamoto, Y., Itoh, H., and Tsujimoto, G., Beta2-adrenergic receptor/cyclic adenosine monophosphate (cAMP) leads to JNK activation through Rho family small GTPases. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) 284 (5): 1199-1203.
28. Hirasawa, A., Awaji, T., Xu, Z., Shinoura, H., and Tsujimoto, G., Regulation of subcellular localization of alpha1-adrenoceptor subtypes. *Life Sci* (2001) 68 (19-20): 2259-2267.
29. Yamauchi, J., Tsujimoto, G., Kaziro, Y., and Itoh, H., Parallel regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) and MKK6 in Gq-signaling cascade. *J Biol Chem* (2001) 276 (26): 23362-23372.
30. Takei, Y., Swietlik, M., Tanoue, A., Tsujimoto, G., Kouzarides, T., and Laskey, R., MCM3AP, a novel acetyltransferase that acetylates replication protein MCM3. *EMBO Rep* (2001) 2 (2): 119-123.
31. Yamauchi, J., Itoh, H., Shinoura, H., Miyamoto, Y., Hirasawa, A., Kaziro, Y., and Tsujimoto, G., Involvement of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in alpha1B-adrenergic receptor/Galphaq-induced inhibition of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) 281 (4): 1019-1023.
32. Katahira, S., Sugawara, T., Tsujimoto, G., Sugiyama, A., Tada, Y., Hashimoto, K., Effects of alpha1-adrenoceptor blockade on canine ischemia/reperfusion-induced arrhythmias. *Asia Pacific J Pharmacol* (2001) 15:47-56
33. Katsuma S, Nishi K, Tanigawara K, Ikawa H, Shiojima S, Takagaki K, Kaminishi Y, Suzuki Y, Hirasawa A, Ohgi T, Yano J, Murakami Y, Tsujimoto G.: Molecular monitoring of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by cDNA microarray-based gene expression profiling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2001) 288:747-751.

34. Tanoue A, Nasa Y, Shinoura H, Oshikawa S, Kawai T, Sunada S, Takeo S, Tsujimoto G.: The α 1D-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin. Invest.* (2002) 109: 765-775.
35. Tanoue A, Koshimizu T, Tsuchiya M, Ishii K, Oawa M, Saeki M, Tsujimoto G.: Two novel transcripts for human endothelin B receptor produced by RNA editing /alternativesplicing from a single gene. *J. Biol. Chem.* (2002) 277 : 33205-33212.
36. Tanoue A, Koba M, Miyawaki S, Koshimizu T, Hosoda C, Oshikawa S, Tsujimoto G.: Role of the α 1D-adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension. *Hypertension.* (2002) 40: 101-106.
37. Yoshida N, Nishimaki Y, Sugiyama M, Abe T, Tatsumi T, Tanoue A, Hirasawa A, Tsujimoto G.: SNP genotyping in the β 2-adrenergic receptor by electronic microchip assay, DHPLC, and direct sequencing. *J. Hum. Genet.* (2002) 47: 500-503.
38. Heishi M, Kagaya S, Katsunuma T, Nakajima T, Yuki K, Akasawa A, Maeda M, Gunji S, Sugita Y, Tsujimoto G, Saito H.: High-density oligonucleotide array analysis of mRNA transcripts in peripheral blood cells of severe atopic dermatitis patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (2002) 129: 57-66.
39. Nakajima T, Inagaki N, Tanaka A, Tanaka H, Yoshikawa M, Tamari M, Hasegawa K, Matsumoto K, Tachimoto H, Ebisawa M, Tsujimoto G, Matsuda H, Nagai H, Saito H. Marked increase in CC chemokine gene expression in both human and mouse mast cell transcriptomes following Fce resector l cross-linking. *Blood.* (2002) 100: 3861-3868.
40. Matsumoto Y, Oshida T, Obayashi I, Imai Y, Matsui K, Yoshida N-L, Nagata N, Ogawa K, Obayashi M, Kashiwabara T, Gungi S, Nagasu T, Sugita Y, Tanaka T, Tsujimoto G, Hirasawa A, Saito H. Identification of highly expressed genes in peripheral blood T cells from patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* (2002) 129(4): 327-340, 2002.
41. Yoshida N, Sugiyama M, Tanoue A, Hirasawa A, Tsujimoto G. Determination of a novel haplotype of β 2-adrenergic receptor in the Japanese population by the combination of the electronic microchip assay using the NanoChip system with allele-specific PCR *Drug Metab Pharmacokinet in press*
42. Ishiwata H, Katsuma S, Kizaki K, Patel O-V, Nakano H, Takahashi T, Imai K, Hirasawa A, Shiojima S, Ikawa H, Suzuki Y, Tsujimoto G, Izaike Y, Todoroki J, Hashizume K. Characterization of Gene Expression Profiles in Early Bovine Pregnancy Using a Custom cDNA Microarray. *Mol Report Dev in press*
43. Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, Suzuki Y, Ikawa H, Takagaki K, Kaminishi Y, Murai M, Ohgi T, Yano J, Tsujimoto G. Functional genomic search of G-protein coupled receptors (GPCR) using microarrays with normalized cDNA library. *Methods in Enzymology* (2002) 345: 585-600.
44. Katsuma S, Tsujimoto G. Genome medicine promised by microarray technology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* (2001) 1: 89-94.
45. Tsujimoto G, Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, Tanoue A. Functional genomic research of alpha 1-adrenoceptors. *J Cardiovasc Pharmacol.* (2001) Oct;38 Suppl 1:S1-5.

7. 知的所有権の取得状況

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

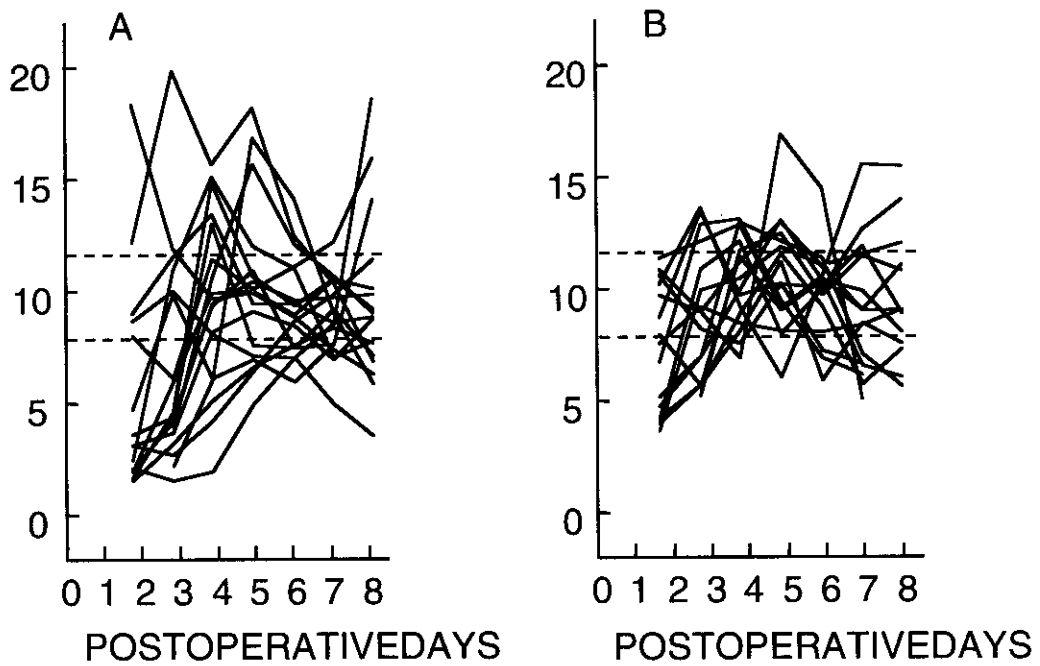


Fig 1. 生体肝移植患者におけるタクロリムス術直後の血中濃度推移。A, 術時小腸組織の採取を行わなかった症例 (n=19)。B, 術時の小腸MDR1 mRNA発現量に基づく初期投与量設定を行った症例 (n=16)。点線は目標値領域。

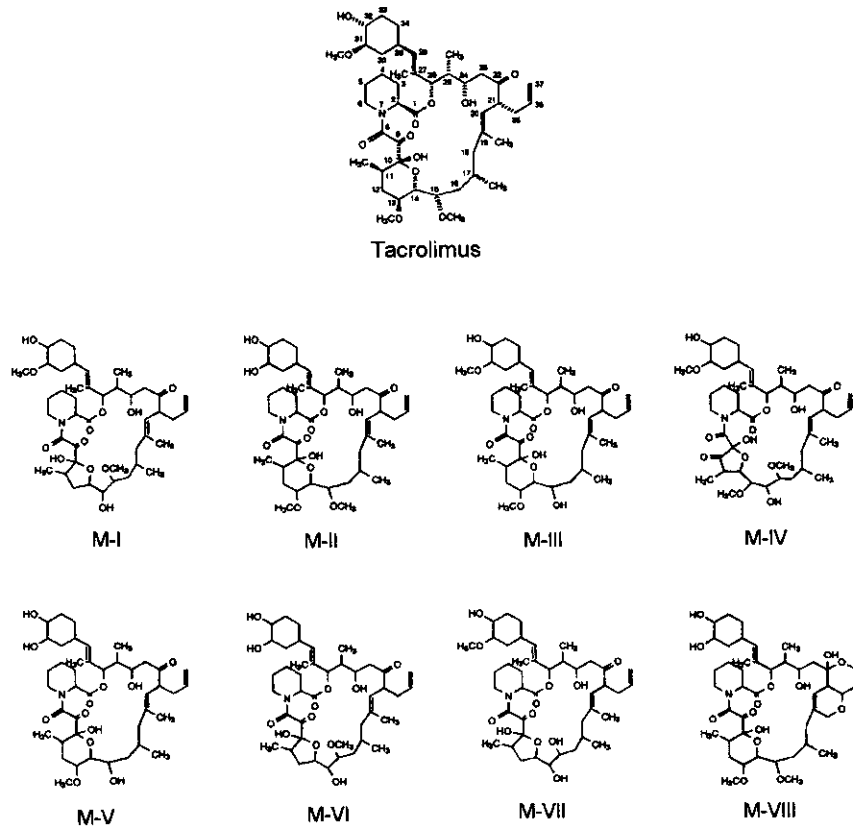


Fig 2. タクロリムス及びその代謝物 (M-I~M-VIII) の構造

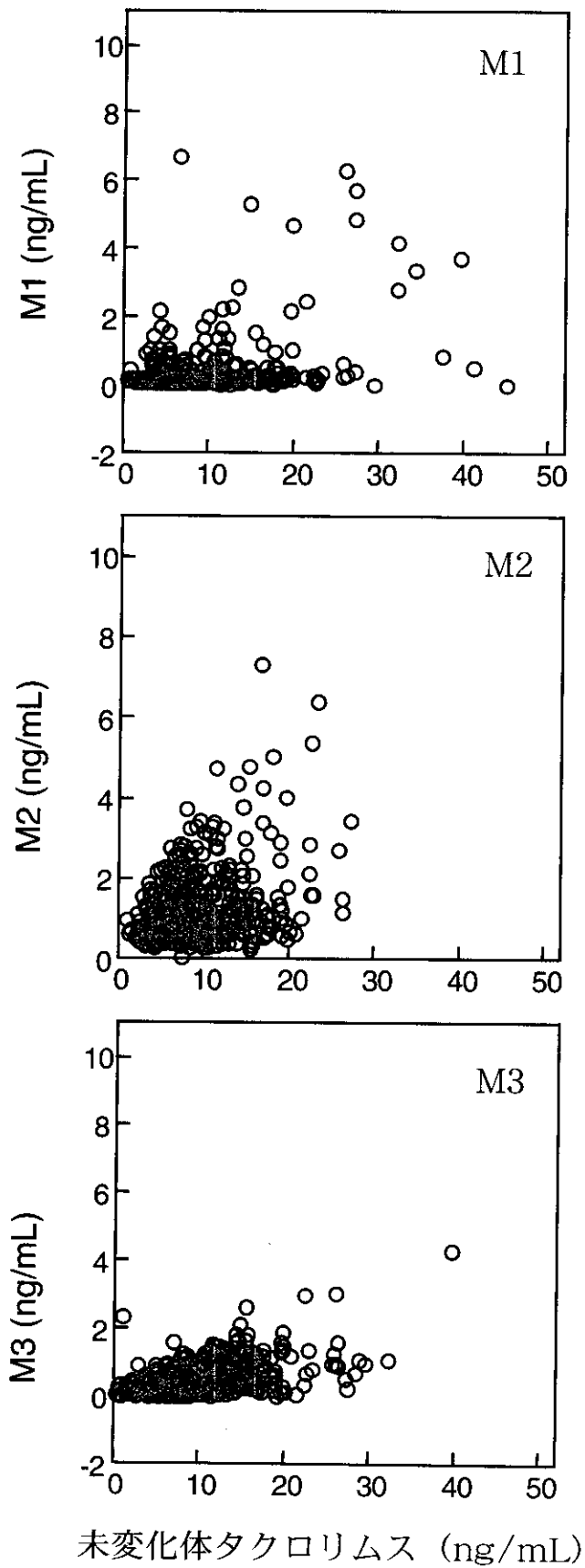


Fig 3. 生体肝移植患者における末梢血中未変化体タクロリムス濃度と種々代謝物濃度との関係。