

- 遺伝子発現変動の解析

ヒト喉頭癌由来 HEp-2 細胞を、 2×10^5 / 90 mm plate の密度で蒔き、対数増殖期に達した後、20 mM の BCH を培地に添加し、非添加群とともに、さらに 12 時間培養した。BCH 添加、非添加の培養細胞から RNA を抽出し、UniSet Human I Expression Bioarray chip (Amersham Biosciences) を用いて遺伝子発現を測定した。ハイブリダオゼーション、及び解析を CodeLink システムによって行った。

(倫理面への配慮)

本年度は、ヒト個人を対象とした研究や、個々人の遺伝子の解析等は含まない。本年度は、主にヒト由来のすでに確立された細胞株、及びアフリカツメガエル卵母細胞を実験に使用した。実験動物としては、アフリカツメガエルのみを用い、その使用にあたっては、麻酔下での操作を実施し、十分な配慮のものに行った。C. 研究結果

(1) 硫酸抱合体を選択的に輸送する有機アニオントランスポーター-OAT7 の同定。
有機アニオントランスポーター-OAT1 の翻訳領域の塩基配列を用いて EST (expressed sequence tag) データベースの検索を行い、OAT1 類似配列 GenBank™/EBI/DBJ accession No. AA705512 を見い出した。これに相当する配列を逆転写-PCR により増幅し、その増幅産物を ^{32}P -dCTP でラベルしてプローブとして、cDNA ライブラリ

ーをスクリーニングした。得られたクローンすなわち、ヒト OAT7 の cDNA を含むクローンについて、塩基配列決定のための合成プライマーを用いてダイターミネーターサイクルシーケンシング法 (Applied Biosystems 社) により、cDNA の塩基配列を決定した。これにより、ヒト OAT7 遺伝子の塩基配列が得られた。また、cDNA の塩基配列を常法により解析して、cDNA の翻訳領域とそこにコードされるヒト OAT7 のアミノ酸配列を決定した。OAT7 は、ヒト有機アニオントランスポーター-OAT1 と 42%、ラット有機アニオントランスポーター-OAT2 と 35%、ヒト有機アニオントランスポーター-OAT3 と 41%、ヒト有機アニオントランスポーター-OAT4 と 46% のアミノ酸配列の相同性を有していた。TopPred2 アルゴリズムにより、OAT7 のアミノ酸配列を解析した結果、112 の膜貫通領域 (membrane-spanning domain) が予想された。また、第 1 の親水性ループに糖鎖付加部位、第 2、第 4、第 6 の親水性ループにプロテインキナーゼ C 依存性のリン酸化部位と考えられる部位があった。

OAT7 の cDNA の全長を EcoRI で切り出し、 ^{32}P -dCTP でラベルしてプローブとして、Human Blot (クロンテック社) 用いて、添付のプロトコールに従い、ハイブリダイゼーションを行なった。ノーザンブロッティングの結果、肝のみにおいて 2.4、3.0、及び 4.4 kb 付近にバンドが検出された。ま

た、胎児組織のノーザンブロッティングにおいて、胎児肝、胎児腎、胎児肺、胎児脳を比較したが、胎児肝にのみ発現が検出された。バンドのサイズは、成体肝のものと同じであった。

ヒト OAT7 の 542-552 に相当する合成オリゴペプチド[CKQEDPRVEVTQ]に対する特異抗体を Altman らの方法に準じて作製した [Altman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 第 81 巻、2176-2180 項、1984 年]。N-末端のシステイン残基は、KLH コンジュゲーションのために導入した。ヒト肝全タンパク質及ヒト肝タンパク質膜画分（ともに BIOCHAIN 社から購入）を、SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、Hybond-P PVDV トランスファー膜にブロッティングし、ペプチドアフィニティー精製抗 OAT7 抗体 (1:100) で処理した。その結果、ヒト肝全タンパク質及ヒト肝タンパク質膜画分ともに、抗 OAT7 抗体によって、50 kDa 付近にバンドが検出された。さらに、常法に従い、ヒト肝パラフィン切片 (BIOCHAIN 社から購入) をペプチドアフィニティー精製抗 OAT7 抗体 (1:100) で処理後、ジアミノベンチジンで発色した。また、染色の特異性を検討する目的で、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗原ペプチドの存在下でペプチドアフィニティー精製抗 OAT7 抗体 (1:100) で処理する実験も行った。その結果、肝細胞に染色が見られ、この染色は、抗原ペプチドの存在下で抗 OAT7 抗血清を作用させた場合には検

出されず、染色の特異性が示された。OAT7 の染色は、肝細胞の側底膜に限局し、OAT7 タンパク質は肝細胞側底膜 (類洞側膜) に存在することが明らかになった。

ヒト OAT7 遺伝子 cRNA 20ng を卵母細胞に注入することによって発現させ、3日間培養した。ヒト OAT7 遺伝子 cRNA を注入した卵母細胞及び対照として水を注入した卵母細胞について、基質として [^3H]estrone sulfate (50 nM) 及び [^3H]dehydroepiandrosterone sulfate (100 nM) を含む ND96 溶液 [96 mM 塩化ナトリウム、2 mM 塩化カリウム、1.8 mM 塩化カルシウム、1 mM 塩化マグネシウム、5 mM HEPES、pH7.4] 中にて卵母細胞を 60 分間放置して、細胞内に取り込まれた放射能のカウントで基質の取り込み率を測定した。その結果、 [^3H]estrone sulfate の取り込み、及び [^3H]dehydroepiandrosterone sulfate の取り込みは、OAT7 を発現させた卵母細胞では、対照として水を注入した卵母細胞に比し、有意に高値を示した。

基質 [^3H]estrone sulfate 及び [^3H]dehydroepiandrosterone sulfate の濃度の違いによる基質 [^3H]estrone sulfate 及び [^3H]dehydroepiandrosterone sulfate の取り込み率の変化を調べることにより、OAT7 のミカエリス-メンテン動力学試験を行った。その結果、 [^3H]estrone sulfate 及び [^3H]dehydroepiandrosterone sulfate の K_m 値はそれぞれに対して $8.7 \pm 1.1 \mu\text{M}$ 、

2.2 ± 0.3 μM (平均 ± 標準誤差)であった。

ヒト OAT7 遺伝子 cRNA を注入した卵母細胞による [3H]estrone sulfate の取り込み実験において、系への各種有機アニオン及び有機カチオン添加の影響を調べたところ、有機アニオン及び有機カチオンのうちで、estrone sulfate、dehydroepiandrosterone sulfate、及びβ-estradiol sulfate によって有意な cis-阻害効果が観察された。加えて、Sulfobromophthalein (BSP)、及び Indocyanin green (ICG) によって有意な cis-阻害効果が観察された。

OAT7 は肝細胞側底膜 (類洞側膜) に存在する有機アニオントランスポーターであり、外来性異物やステロイドホルモンの硫酸抱合体を主に輸送基質とするものであることが明らかとなった。

(2) 腎に発現する新規アミノ酸トランスポーターLAT4 の同定と解析。

平成14年度の研究において、ヒト肝細胞癌細胞株 FLC4 より、発現クローニングの手法を用いて、新規アミノ酸トランスポーターLAT3 を同定した。LAT3 は、既存のトランスポーターファミリーに属さず、新規トランスポーターファミリーを形成するものであった。この新規ファミリーは、HUGO human Gene Nomenclature Committee により、SLC43 (solute carrier family 43) と命名された。LAT3 の塩基配列を用い、EST

(expressed sequence tag) データベース、及び公開されたヒトゲノム及びマウスゲノムシーケンスデータベースの BLAST 検索を行った。その結果、LAT3 類似の新規配列 (LAT4 と命名) が得られ、その全長 cDNA を入手し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させて機能解析を行った。LAT4 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニンを Na⁺-非依存的に輸送し、LAT3 と同様な機能特性を示した。

LAT4 は、LAT3 と 58%の相同性を示すタンパク質であり、LAT3 とともにトランスポーターファミリーSLC43 の新たなメンバーとなった。ノーザンプロットの結果、LAT4 は、腎臓、胎盤、脳、小腸において強く発現していることが明らかとなり、免疫組織学的検討により、腎では尿管への局在発現が示された。また、胎盤においては、合体絨毛細胞の細胞膜への発現が示され、胎盤の介する物質透過の通路として機能していると考えられる。LAT4 は、腎及び胎盤でのアミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送に関与することが示唆される。

(3) 悪性腫瘍のアミノ酸トランスポーターの抑制による細胞増殖抑制効果。

LAT1 は、正常組織における発現は、脳、胎盤、骨髄、精巣等に限られ、胎児肝において強発現するが、成体肝においては発現は検出されない。LAT1 の部分配列は、機能未同定の癌関連配列TA1 (Sang, J. et al.

Cancer Res. 55: 1152-1159, 1995; Wolf, D. A., et al. *Cancer Res.* 56: 5012-5022, 1996)としてすでに報告されていた。そこで、LAT1 と悪性腫瘍との関わりを明らかにするために、我々はヒト腫瘍細胞株及びヒト悪性腫瘍組織での発現を検討した。その結果、検討した30種類に及ぶヒト腫瘍細胞株に LAT1 が強発現すること、さらに大腸癌、胃癌、乳癌、膵癌、腎癌、喉頭癌、食道癌等、多くのヒト悪性腫瘍組織で4F2hc とともに発現が亢進し特徴的な分布を示すことが明らかになった。特に大腸癌と胃癌においては、癌組織と一致して、LAT1 及び 4F2hc の強染色が得られ、両者ともに、網状あるいは顆粒状の染色像が腫瘍細胞内全体に広がり、同時に細胞膜も強染する像 (“diffuse pattern” の染色像) が得られた。これに対して、正常大腸粘膜では、LAT1 及び 4F2hc タンパク質は少量検出されるものの、両者ともに核上部のゴルジ装置と思われる小領域に限極した形で存在し、細胞膜での染色は見られなかった (“nodular pattern” の染色像)。20例の大腸癌、50例の胃癌について検討したが、ほぼ全例において、悪性腫瘍組織においては diffuse pattern を、正常大腸粘膜では nodular pattern を示した。胃癌においては、粘膜下に侵潤し、散在する悪性腫瘍細胞が LAT1 及び 4F2hc に強染する像が得られた。乳癌においては、MIB-1 labeling index と LAT1 の発現が正の相関

関係を示した。従って、LAT1 が腫瘍細胞に発現の亢進するシステム L の分子実体であることが明らかになった。

腫瘍細胞増殖における LAT1 の役割を検討する目的で、古典的システム L 抑制薬 BCH 及び LAT1 特異的なアンチセンスオリゴ DNA の腫瘍細胞増殖に対する効果を検討した。BCH は、検討したヒト腫瘍細胞株 (30種類) のほとんどに対して、その増殖を濃度依存的に抑制した。LAT1 のアンチセンスオリゴ DNA を用いても同様な結果が得られ、S 化した LAT1 のアンチセンスオリゴ DNA を含む培地中で培養することにより、有意な LAT1 タンパク質の減少、¹⁴C-ロイシンの取り込みの低下が観察され、それにともない細胞増殖の指標となる ³H-チミジンの取り込みの有意な低下が観察された。

LAT1 抑制の効果を *in vivo* で検討する目的で、癌移植マウスにおける、BCH 投与による延命効果を検討した。ICR マウスに Sarcoma 180 細胞を腹腔内に接種し、BCH、LAT1 抑制効果のない D-アラニン、vehicle の各 10 日間投与の効果と比較した。その結果、BCH 投与群 (平均生存日数 17.6 ± 0.5) は、D-アラニン投与群 (平均生存日数 12.2 ± 0.6)、vehicle 投与群 (平均生存日数 13.0 ± 0.3) に比し、有意に ($P < 0.05$) 生存日数が延長することが明らかになった。同様な延命効果は、LAT1 アンチセンスオリゴ DNA を腹腔内注入した

際にも得られた。さらに、ヒト膀胱癌 T24 細胞をヌードマウスに接種して形成させた皮下腫瘍に、BCH を連続 20 日間腫瘍内注入することにより、腫瘍増大の抑制が観察された。LAT1 アンチセンスオリゴ DNA を腫瘍内注入した際にも、同様な腫瘍増大抑制効果が得られた。

LAT1 が、いわゆる腫瘍細胞型のシステム L トランスポーターであるのに対し、一般の正常組織には 4F2hc のパートナーとして、システム L の第二のアイソフォームである LAT2 が存在する。前述のように、正常組織でも LAT1 は、限られた組織に存在するが、そこでは、LAT2 もともに発現しており、LAT1 選択的な抑制法は、正常細胞に対する障害の少ない、腫瘍細胞選択的な効果を期待できる。薬理的検討により、LAT1 と LAT2 は基質結合部位の形状が異なることが示唆された。

LAT1 選択的な高親和性抑制薬の創製を目的として、構造活性相関の解析に基づき化合物デザインを行い、LAT1 を高発現するヒト膀胱癌由来 T24 細胞のアミノ酸輸送阻害活性を指標にスクリーニングした。その結果、BCH に比し LAT1 への親和性が約 1,000 倍高い ($IC_{50} = 0.1 \sim 0.3 \mu M$)、2 種の新規化合物 KYT0193 及び KYT0206 を得た。KYT0193 は、LAT1 及び LAT2 に同程度の親和性を示したが、KYT0206 は LAT1 選択的に作用することが明らかとなった。T24 細胞に対する作用を検討したところ、両者と

もにアミノ酸取り込み阻害活性に相当する濃度依存的な増殖抑制効果を示した。抗腫瘍効果を *in vivo* で検討する目的で、ヌードマウスに形成させた T24 細胞皮下腫瘍に KYT0193 を腫瘍内注入したところ、腫瘍増大の抑制が観察された。さらに、マウス Sarcoma 180 細胞腹水癌モデルにおいて、KYT0193 を腹腔内投与したところ、KYT0193 投与群は、vehicle 投与群に比し、有意に生存日数が延長することが明らかになった。

BCH による LAT1 抑制の細胞増殖抑制機構を明らかにするために、ヒト喉頭癌由来扁平上皮癌細胞 HEp-2 細胞を用い、BCH の処理による遺伝子発現変動を CodeLink システムによって解析し、シスプラチンによって惹起される遺伝子発現変動と比較した。その結果、発現上昇を示す遺伝子群のうち、BCH 処理に特異的な遺伝子が 27 個、シスプラチン 処理に特異的な遺伝子が 356 個、共通に変動する遺伝子が 28 個存在した。また、発現低下を示す遺伝子群のうち、BCH 処理に特異的な遺伝子が 43 個、シスプラチン 処理に特異的な遺伝子が 382 個、共通に変動する遺伝子が 13 個存在した。従って、BCH による増殖抑制にともなう HEp-2 細胞の遺伝子発現変動は、シスプラチンによる遺伝子発現変動と質、量ともに大きく異なることが明らかとなり、LAT1 抑制は、シスプラチンとは異なる細胞内機序で増殖抑制効果を示すことが確認された。

D. 考察

トランスポーター（輸送体）は、細胞膜あるいは細胞内膜系を介する物質の輸送を媒介する膜タンパク質であり、糖やアミノ酸等の栄養素や、アニオン性、カチオン性薬物及び外来性異物、あるいは薬物、外来性異物の代謝物等の親水性化合物の経細胞膜輸送にとって必須の分子である。従来その実体把握が困難であったため、特に病態との関わりに関しては一部を除いて詳細な研究はなされていなかった。しかし、公表されたヒトゲノム概要配列によると、トランスポーターと思われるタンパク質をコードする遺伝子は予想以上に多く、5~10%の疾患がトランスポーター異常を原因とすると推定されている。将来的には、全遺伝子の網羅的解析の一貫として、トランスポーター遺伝子の解析が疾患解析の中に組み込まれ、さらにトランスポーターの遺伝子多型とその表現型に関する情報が蓄積され、病態との関わりが包括的に把握されていくものと思われる。トランスポーターと病態との関わりは、二つの観点からの研究が必要とされる。第一は、トランスポーターの遺伝子異常あるいは遺伝子多型自体が疾患の誘因となる点であり、第二は、トランスポーターの機能自体が病態形成に積極的に関わる場合である。前者に関しては、トランスポーターの遺伝子型とその表現型に関する膨大な情報を今後蓄積していくことが要求され、後者に関しては、病態

に伴うトランスポーター遺伝子の発現変動解析を全遺伝子の網羅的解析の一貫として行っていくとともに、トランスポーターの機能亢進状態、あるいは機能抑制に伴う、種々の遺伝子の発現変動を把握する必要がある。そこに至るには、従来の単発的な分子クローニングと機能解析の成果を手掛かりにして、ゲノム上の機能未同定の遺伝子の機能を丹念に明らかにしていくことから始めなければならない。その方向性に添って、平成14年度に続き平成15年度は、薬物及び毒性化合物の輸送を担当する有機陽イオン、陰イオン、アミノ酸等の細胞膜輸送体の分子同定を中心とした研究を行った。加えて、それらを修飾した時に生じる遺伝子変化を網羅的に解析するための解析系の立ち上げを行った。

本年度分子同定の対象としたのは、SLC22及びSLC43に分類される、薬物及び毒性化合物の細胞膜輸送を担当する輸送体である。本年度は、ゲノム情報のBLAST検索を行い、一群の有機化合物の硫酸抱合体を中心に輸送する新規有機アニオントランスポーターOAT7、及び新規輸送系Lアミノ酸トランスポーターLAT4の2種の新規トランスポーターを同定し、解析を行った。OAT7は、肝細胞側底膜（類洞側膜）に存在する有機アニオントランスポーターであり、外来性異物やステロイドホルモンの硫酸抱合体を主に輸送基質とするものである。OAT7は、肝細胞内で生成したステロイドホルモン、

薬物あるいは生体異物等の硫酸抱合体の血液中への移行を司るトランスポーターであると考えられる。OAT7 を介して血中に放出された硫酸抱合体は、腎近位尿細管血管側膜に存在する有機アニオントランスポーターOAT3 により尿細管上皮細胞内に取り込まれ、平成 14 年度に同定した管腔側の OAT₁ によって尿中に排泄されると想定される。OAT7 は、薬物やステロイドホルモンの代謝物の肝代謝と腎排泄を繋ぐトランスポーターとして位置付けられる。

新規輸送系 L アミノ酸トランスポーター LAT3 及び LAT4 は、既知の系 L アミノ酸トランスポーターLAT1 及び LAT2 とは異なる構造と機能特性を有しているものであり、これにより新たなトランスポーターファミリー (HUGO Gene Nomenclature Committee により最終的に SLC43 と命名) を確立することができた。特に LAT4 は、腎では腎尿細管及び胎盤でのアミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送経路として位置付けられる。

悪性腫瘍は、急速で持続的な増殖を行うが、その増殖維持のために糖やアミノ酸のトランスポーターの発現が亢進し、それらの栄養素の細胞への大量の取り込みを維持している。従って、これらの栄養素のトランスポーターは腫瘍細胞増殖の律速段階の一つとなっており、このため悪性腫瘍細胞は、細胞の生存維持におけるトランスポーターの役割を研究する上で、有用な材料とされている。また、こういった悪性腫瘍細胞のトランスポーターは、その機能抑制により細胞増殖抑制が得られる可能性が期待され、新しい観点からの抗腫瘍薬の標的と

しての可能性を有している。特に、腫瘍細胞の必須アミノ酸の輸送を担当するトランスポーターは、腫瘍細胞が自ら合成できない必須栄養素の細胞への供給を担当するものであり、その抑制薬は、腫瘍細胞のいわゆる「兵糧攻め」を可能とすると考えられている。

アミノ酸トランスポーターは古典的には、アミノ酸輸送システムとして記載され、アミノ酸分子の多様性を反映して多くの輸送システムが同定されている。腫瘍細胞においては、中性アミノ酸に属する必須アミノ酸の多くは、システム L と呼ばれる輸送システムを介して細胞へ供給される。システム L は、分枝アミノ酸や芳香族アミノ酸等の大型側鎖を持つ中性アミノ酸を選択的に輸送する輸送システムであり、1960 年代に BCH (2-aminobicyclo-(2, 2, 1) - heptane-2-carboxylic acid) というアミノ酸取り込み抑制薬に特異的な輸送システムとして記載された。すでに我々は、1998 年にシステム L の分子実体を同定し、それが LAT1 (L-type amino acid transporter 1) と名付けた 1 2 回膜貫通型のタンパク質と、1 回膜貫通型糖タンパク質である 4F2hc (4F2 heavy chain) のヘテロ二量体として形成されることを明らかにした。この LAT1 は、正常組織における発現は、脳、胎盤、骨髄、精巣等に限られ、胎児肝において強発現するが、成体肝においては発現は検出されない。これに対して、LAT1 は悪性腫瘍組織に強く発現することが明らかとなり、今までに大腸癌、胃癌、乳癌、膵癌、腎癌、喉頭癌等に強発現することが確認されている。

本年度の研究により、癌・胎児性抗原と

しての発現パターンを示す必須アミノ酸トランスporter-LAT1 が、腫瘍細胞に高発現し、腫瘍細胞の増殖に必須のタンパク質であることが示された。さらに、LAT1 の抑制は、*in vitro* において増殖抑制効果があるのみならず、*in vivo* においても腫瘍増大抑制効果と腫瘍接種動物の延命効果が確認された。LAT1 の発現は、抗体を用いた病理組織学的手法により容易に確認でき、診断と直結した治療法の選択が可能となる。本研究において開発された腫瘍細胞特異アミノ酸トランスporter-LAT1 の特異的な高親和性抑制薬は、新規作用機序の抗腫瘍薬として、その有用性が期待される。

本年度の研究では、BCH による LAT1 抑制の細胞増殖抑制機構を明らかにするために、ヒト喉頭癌由来扁平上皮癌細胞 HEP-2 細胞を用い、BCH の処理による遺伝子発現変動を CodeLink システムによって解析し、シスプラチンによって惹起される遺伝子発現変動と比較した。その結果、1分子を標的とする BCH は、現行の抗腫瘍薬であるシスプラチンに比し、発現変動を示す遺伝子数が少なく、LAT1 抑制は、シスプラチンとは異なるより細胞内機序で増殖抑制効果を示すことが確認された。本研究で観察された変動遺伝子の情報を基に、トランスporter阻害による細胞増殖抑制の細胞内機序を明らかにするとともに、シスプラチンはじめとする既存の抗腫瘍薬や各種毒性化合物による細胞増殖抑制における遺伝子発現変動プロフィールとのより詳細な比較を通して、トランスporter阻害による細胞増殖抑制の特異性を明確にしていくことが今後の課題となる。

E. 結論

本研究により、硫酸抱合体を輸送する有機アニオントランスporter-OAT7 及び腎、胎盤でのアミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送経路となると考えられる輸送系 L アミノ酸トランスporter-LAT4 の2種の新規トランスporterが同定された。また、本研究により、腫瘍細胞特異必須アミノ酸トランスporter-LAT1 の抑制に抗腫瘍効果があることが示され、LAT1 の抑制は既存の抗腫瘍薬とは異なる機序で増殖抑制作用を示すことが、DNA マイクロアレイ解析により明かとなった。

F. 健康危機情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ichida, K., Hosoyamada, M., Kimura, H., Takeda, M., Utsunomiya, Y., Hosoya, T., Endou, H.: Urate transport via the human PAH transporter hOAT1 and its gene structure. *Kidney Int.* 63: 143-155, 2003
2. Khamdang, S., Takeda, M., Babu, E., Noshiro, R., Onozato, M.L., Tojo, A., Enomoto, A., Huang, X.L., Narikawa, S., Anzai, N., Piyachaturawat, P. and Endou, H.: Interaction of human and rat organic anion transporter 2 with various cephalosporin antibiotics. *Eur. J. Pharmacol.* 465: 1-7, 2003
3. Okubo, M., Yamada, K., Hosoyamada, M., Shibasaki, T. and Endou, H.: Cadmium transport by human Nramp 2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 187: 162-167,

- 2003
4. Enomoto, A., Takeda, M., Taki, K., Takayama, F., Noshiro, R., Niwa, T. and Endou, H. : Interactions of human organic anion as well as carion transporters with indoxyl sulfate. *Euro. J. Pharmacol.* 466: 13-20, 2003
 5. Satoh, H., Moriyama, N., Hara, C., Yamada, H., Horita, S., Kunimi, M., Tsukamoto, K., Iso-o, N., Inatomi, J., Kawakami, H., Kudo, A., Endou, H., Igarashi, T., Goto, A., Fujita T and Seki G: Localization of $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter (NBC-1) variants in rat and human pancreas. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284: C729-C737, 2003
 6. Kanai, Y. and Endou, H. : Functional properties of multispecific amino acid transporters and their implications to transporter-mediated toxicity. *J. Toxicol. Sci.* 28: 1-17, 2003
 7. Hasegawa, M., Kusuhara, H., Endou, H. and Sugiyama, Y. : Contribution of organic anion transporters to the renal uptake of anionic compounds and nucleoside derivatives in rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305(3): 1087-1097, 2003
 8. Jutabha, P., Kanai, Y., Hosoyamada, M., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Iribe, Y., Babu, E., Kim, J.Y., Anzai, N., Chatsudthipong, V. and Endou, H. : Identification of a novel voltage-driven organic anion transporter present at apical membrane of renal proximal tubule. *J. Biol. Chem.* 278(30): 28930-27938, 2003
 9. Hosoya K, Tomi M, Ohtsuki S, Takanaga H, Saeki S, Kanai Y, Endou H, Naito M, Tsuruo T, Terasaki T. : Enhancement of L-cystine transport activity and its relation to xCT gene induction at the blood-brain barrier by diethyl maleate treatment. *J Pharmacol Exp Ther.* Jul;302(1):225-31, 2002
 10. Tanaka M, Itoh K, Matsushita K, Matsushita K, Wakita N, Adachi M, Nonoguchi H, Kitamura K, Hosoyamada M, Endou H, Tomita K. : Two male siblings with hereditary renal hypouricemia and exercise-induced ARF. *Am J Kidney*
 11. Babu E, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim do K, Iribe Y, Tangtrongsup S, Jutabha P, Li Y, Ahmed N, Sakamoto S, Anzai N, Nagamori S, Endou H. : Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters. *J Biol Chem.* 2003 Oct 31;278(44):43838-45. Epub 2003 Aug 20.
 12. Kim GH, Na KY, Kim SY, Joo KW, Oh YK, Chae SW, Endou H, Han JS. : Up-regulation of organic anion transporter 1 protein is induced by chronic furosemide or hydrochlorothiazide infusion in rat kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Aug;18(8):1505-11., 2003
 13. Alebouyeh M^{1,2}, Takeda M¹, Onozato ML³, Tojo A³, Noshiro R¹, Hasannejad H¹, Inotaomi J³, Narikaw S⁴, Huang XL⁴, Khamdang¹, Anzai N¹, and Endou H¹: (¹Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin University School of Medicine, Tokyo 181-8611, Japan, ²Neuroscience Research center, Shahid Beheshti University Medical Sciences, Tehran, Iran, ³Department of Nephrology and Endocrinology, University of Toky, Tokyo 113-8655, Japan, ⁴Kobuchizawa Laboratories, Fuji Biomedix Co., Yamanashi 408-0044, Japan): Expression of human organic anion transporters in the choroid plexus and their interactions with neurotransmitter metabolites. *J Pharmacol sci.* 93:430-436, 2003
 14. Yoon JH, Kim YB, Kanai Y, Endou H. and

- Kim DK: Sequential Increases in 4F2hc expression during DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Anticancer Res.* 23:3877-3882, 2003.
15. Takeda M, Norshio R, Onozato ML, Tojo A, Hasannejad H, Hang XL, Narikawa S and Endou H.: Evidence for a role of human organic anion transporters in the muscular side effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 483: 133-138, 2004.
16. Sakata T, Anzai N, Shin HJ, Norhiro R, Hirata T, Yokoyama H, Kanai Y and Endou H.: Novel single nucleotide polymorphisms of organic cation transporter 1 (*SLC22A1*) affecting transport functions. *Biochem Biophys Res Comm.* 313: 789-793, 2004.
17. Koepsell H, Endou H.: The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch.* 2003 Jul 19, in press
18. Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y.: CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.* 2003 Jun 11, in press
19. Hasannejad H, Takeda M, Taki K, Jung SH, Babu E, Jutabha P, Khamdang S, Aleboyeh M, Onodera ML, Tojo A, Enomoto A, Anzai N, Narikawa S, Huang XL, Niwa T, Endou H.: Interactions of human organic anion transporters with diuretics. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Nov 10 in press
20. 遠藤 仁, 宮崎博喜, 安西尚彦:
新規尿酸トランスポーターURT1の同定と尿酸研究の現状. *蛋白質核酸酵素*, 48(1): 18-25, 2003
21. 遠藤 仁: サイエンスエッセイ, 日薬雑誌 121: 196, 2003
2. 口頭発表
1. 金井好克: アミノ酸及び有機酸の輸送とその異常症. 第34回に鑄型腎臓懇話会, 新潟, 平成14年4月11日.
2. 金井好克: アミノ酸センサーの探索. 平成15年度生理学研究所研究会「バイオ分子センサー研究会」, 岡崎, 平成15年5月21日.
3. 遠藤 仁: シンポジウム「腎性低尿酸血症」. 第46回日本腎臓学会学術総会, 東京, 平成15年5月22日.
4. 関根孝司¹, 薦田房子¹, 稲富 淳¹, 榎本 篤², 遠藤 仁², 大田敏之³, 松山 健³, 池田昌弘⁴, 栗津 緑⁶, 五十嵐 隆¹ (¹東京大学医学部小児科, ²杏林大学医学部薬理学, ³県立広島病院小児科, ⁴公立福生病院小児科, ⁵都立清瀬小児病院腎内科, ⁶慶応大学小児科): 特発性腎性低尿酸血症における尿酸トランスポーター(hURAT1)遺伝子異常の解析. 第46回日本腎臓学会学術総会, 東京, 平成15年5月22日.
5. 榎本 篤¹, 武田理夫², 小野里マリステラリカ³, 藤乗嗣泰¹, 瀧健太郎¹, 高山文夫¹, 丹羽利充¹, 遠藤 仁² (¹名古屋大学医学部付属病院, ²杏林大学医学部薬理学, ³Department of Nephrology and Endocrinology

- University of Tokyo, Tokyo, Japan) :
ヒト有機アニオントランスポーター
(hOAT)によるインドキシル硫酸(IS)輸
送の意義. 第46回日本腎臓学会学
術総会, 東京, 平成15年5月22日.
6. 田中元子¹, 伊藤和子¹, 松下和孝¹,
脇田直樹², 安達政隆², 北村健一郎²,
細山田真³, 遠藤 仁³, 富田公
夫² (¹松下会あけぼのクリニック腎臓
内科, ²熊本大学第三内科, ³杏林大
学医学部薬理学) : 運動後急性腎
不全を来した遺伝子腎性低尿酸血症
の兄弟例. 第46回日本腎臓学会学
術総会, 東京, 平成15年5月22日.
 7. 細山田真¹, 市田公美², 榎本 篤³,
細谷龍男², 遠藤 仁¹ (¹杏林大学医
学部薬理学, ²東京慈恵会医科大学腎
臓高血圧内科, ³名古屋大学予防医療
部) : 尿酸トランスポーター1のマウ
ス腎における機能及び局在の解析.
第46回日本腎臓学会学術総会, 東京,
平成15年5月22日.
 8. 安西尚彦, 武田理夫, Habib
Hassannejad, 辛 祐禎, 遠藤 仁:
ヒト有機アニオントランスポーター
(hOAT)と利尿薬との相互作用. 第46
回日本腎臓学会学術総会, 東京, 平
成15年5月22日.
 9. 鈴木喜郎¹, 安岡有紀子¹, 細山田真²,
遠藤 仁², 河原克雅¹ (¹北里大
学医学部生理学, ²杏林大学医学部薬
理学) : 内向き整流性カリウムチャ
ネルKir7.1の遠位部尿細管由来新規
培養細胞における発現. 第46回日
本腎臓学会学術総会, 東京, 平成15
年5月23日.
 10. 細山田真¹, 西堀由紀野², 楊 國昌²,
遠藤 仁¹ (¹杏林大学医学部薬理
学, ²杏林大学医学部小児科) : ピュ
ーロマイシンアミノヌクレオシドネフ
ローゼモデルにおけるポドシン発現の
変化. 第46回日本腎臓学会学術総
会, 東京, 平成15年5月24日.
 11. 宮崎博喜¹, 安西尚彦¹, Shin HoJung¹,
坂田 武¹, 野々口博史², 富田公夫²,
金井好克¹, 遠藤 仁¹ (¹杏林大
学医学部薬理学, ²熊本大学医学部第
三内科) : ヒト有機アニオントラン
スポーター4(OAT4)とPDZドメインタン
パク質PDZK1の相互作用. 第46回
日本腎臓学会学術総会, 東京, 平成
15年5月24日.
 12. 安西尚彦, 宮崎博喜, Shin HoJung,
野城理絵, 榎本 篤, 金井好克,
遠藤 仁: 腎臓尿酸トランスポータ
ーURAT1細胞内結合タンパク質の同定.
第46回日本腎臓学会学術総会, 東京,
平成15年5月24日.
 13. 脇田直樹¹, 北村健一郎¹, 安達政隆¹,
ドサ トウエン¹, 野々口博史¹,
小田切優樹², 細山田真³, 遠藤 仁³,
富田公夫¹ (¹熊本大学医学部第三

- 内科, ²熊本大学薬学部薬剤科, ³杏林大学医学部薬理学): 家族性腎性低尿酸血症における尿酸トランスポーター (URAT1) 遺伝子異常の解析. 第46回日本腎臓学会学術総会, 東京, 平成15年5月24日.
14. 金井好克: 教育講演「輸送体研究の現状と今後の課題」. 第46回日本腎臓学会学術総会, 東京, 平成15年5月24日.
 15. Kanai, Y.: Amino acid transporters in trans-epithelial transport. World Congress of Nephrology, Berlin, June 9, 2003.
 16. Endou, H.: Urate transport in human kidneys. World Congress of Nephrology, Berlin, June 9, 2003.
 17. Yokoyama H, Anzai N, Chaekuntode S, Shin HJ, Noshiro R, Miyazaki H, Kanai Y and Endou H: Identification of a Novel Organic Anion Transporter OAT8 from the Rat Kidney, World Congress of Nephrology, Berlin, Germany, Berlin, June 9, 2003
 18. 野城理絵, 安西尚彦, 宮崎博喜, 辛祐禎, 坂田 武, 金井好克, 遠藤 仁: Yeast Two-hybrid 法を用いたヒトペプチドトランスポーターPEPT2 結合蛋白質の同定. 第108回日本薬理学会関東部会, 東京, 平成15年6月14日.
 19. Promsuk Jutabha, 古屋祥子, 森本絵美子, 黒田琢磨, Chairoungdua A, 寺岡秀朗, 斎藤邦夫, 金井好克, 呉屋朝幸, 遠藤 仁: 腫瘍特異アミノ酸トランスポーターの新規高親和性抑制薬による抗腫瘍効果. 第108回日本薬理学会関東部会, 東京, 平成15年6月14日.
 20. 遠藤 仁: 「創薬におけるトランスポーターの意義」 第2回ゲノムメディアケア研究会, 東京, 平成15年7月4日.
 21. 金井好克: 腫瘍細胞特異アミノ酸トランスポーターと新規抗腫瘍薬. 第2回ゲノムメディアケア研究会, 東京, 平成15年7月4日.
 22. 金井好克, 遠藤 仁: 創薬における新しい薬物評価システムの応用. 第1回RFB研究会, 東京, 平成15年7月5日.
 23. 遠藤 仁: 理事長基調講演「Current status and future perspective on molecular toxicology」. 第30回日本トキシコロジー学会学術年会. 神奈川, 平成15年7月18日.
 24. 武藤朋子, 金井好克, 和久井信, 遠藤 仁: 実験肉芽組織内血管新生に関するマイクロアレイ解析法を用いた予備的検討. 第30回日本トキシコロジー学会学術年会. 神奈川, 平成15年7月18日.

25. 金井好克: ヘテロニ量体型アミノ酸トランスポーターの細胞膜の移行を規定する因子. 2003年生理学研究所研究会, 岡崎, 平成15年8月11日.
26. Yoshikatsu Kanai: Development of new anti-cancer agents inhibiting essential amino acid transporters. PharmaConference 2003, Pontresina, Switzerland, Aug 20, 2003.
27. Hitoshi Endou: A new drug target, URAT1, for the development of uricosuric agents. PharmaConference 2003, Pontresina, Switzerland, Aug 20, 2003.
28. Hitoshi Endou: Special Lecture "Transporters and new drug development". The 9th Southeast Asian-Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists, Busan, Korea, Aug 22, 2003.
29. Sakata T, Anzai N, Hirata T, Jutabha P, Cha SH, Iribe Y, Kanai Y and Endou H: Cloning and characterization of a novel organic anion transporter (OAT5): apical isoform of the proximal tubules in rat kidney. 3rd International Research Conference PharmaConference 2003 Transporters and Drugs, Pontresina, Switzerland, Aug. 17-21, 2003
30. Miyazaki H, Anzai N, Sakata T, Hirata T, Sakamoto S, Chairoungdua A, Kanai Y and Endou H: The Multivalent PDZ Domain-containing Protein PDZK1 Regulates the Transport Activity of Renal Urate-Anion Exchanger URAT1 via its C-terminal. 3rd International Research Conference PharmaConference 2003 Transporters & Drugs, Pontresina, Switzerland, Aug. 17-21, 2003
31. Ekaratanawong-Chaekuntode S, Anzai N, Miyazaki H, Kanai Y and Endou H: Identification of intracellular binding protein with carnitine transporter 1 (rCT1) in rat brain. 3rd International Research Conference PharmaConference 2003 Transporters & Drugs, Pontresina, Switzerland, Aug. 17-21, 2003
32. Jutabha P, Kanai Y, Hosoyamada M, Iribe Y and Endou H: Identification of a novel voltage-driven organic anion transporter present at apical membrane of renal proximal tubule. 3rd International Research Conference PharmaConference 2003 Transporters & Drugs, Pontresina, Switzerland, Aug. 17-21, 2003
33. Chairoungdua A, Ellapan B, Kanai Y and Endou H: Identification of novel system L amino acid transporters

- structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters
- 3rd International Research Conference PharmaConference 2003 Transporters & Drugs, Pontresina, Switzerland, Aug. 17–21, 2003
34. Sakamoto S, Kanai Y, Shigeta Y, Chairoungdua A, Fujimura M, Nesar A, Itou H and Endou H: A novel missense mutation of SLC7A9 frequent in Japanese cystinuria population causing membrane targeting defect of the transporter protein. 3rd International Research Conference PharmaConference 2003 Transporters & Drugs, Pontresina, Switzerland, Aug. 17–21, 2003
35. Kusuhara H, Nagata Y, Endou H and Sugiyama Y: Characterization of the uptake mechanism for histamine H2 receptor antagonists in the choroid plexus. 3rd International Research Conference PharmaConference 2003 Transporters & Drugs, Pontresina, Switzerland, Aug. 17–21, 2003
36. Sabolic I, Ljubojevic M, Herak-Kramberger CM, Hagos Y, Bahn A, Endou H, Burckhardt G: Rat renal Oat1 exhibits gender differences that are determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition
- 3rd International Research Conference PharmaConference 2003 Transporters & Drugs, Pontresina, Switzerland, Aug. 17–21, 2003
37. Kobayashi Y, Ohshiro N, Shibusawa A, Kohyama N, Ohbayashi M, Sekine T, Endou H and Yamamoto T: Roles of mouse organic anion transporter 3 (mOAT3[Slc22a8]) in renal drug transport 3rd International Research Conference PharmaConference 2003 Transporters & Drugs, Pontresina, Switzerland, Aug. 17–21, 2003
38. Shin HJ, Enomoto A, Anzai N, Kim DK, Cha SH, Choi HW, Kanai Y and Endou H: Identification of a Novel Liver Specific Organic Anion Transporter Selective for Conjugated Drugs and Steroid Hormone 9th Southeast Asian–Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists, Busan, Korea, Aug 21, 2003.
39. 坂本信一¹, 金井好克¹, 茂田安弘,² Arthit Chairoungdua¹, 藤村正亮¹, Nasar Ahmed¹, 安西尚彦¹, 宮崎博喜¹, 伊藤晴夫², 遠藤 仁¹ (杏林大学医学部薬理学教室¹ 千葉大学医学部泌尿器学教室²): 日本人型シスチン尿症変異が明らかにするトランスポ

- ーター細胞膜移行の機序. 第9回分子腎臓研究会, 東京, 平成15年9月6日.
40. 遠藤 仁:平成15年生理学研究所研究会「生体防御の最前線: 上皮輸送制御因子の構造活性相関」, 岡崎, 平成15年10月2日.
41. 細山田真, 遠藤 仁: ピューロマイシンアミノヌクレオシドネフローゼモデルラットにおけるネフリンおよびポドシン発現の経日変化. 第109回日本薬理学会関東部会, 東京, 平成15年10月4日.
42. Ellapan Babu, 金井好克, Chairoungdua Arthit. 入部雄司, 安西尚彦, 遠藤 仁: 発現クローニング法による新規輸送系Lアミノ酸トランスポーターの同定. 第109回日本薬理学会関東部会, 東京, 平成15年10月4日.
43. 安西尚彦, 宮崎博喜, 野城理絵, shin Ho Jung, 平田 拓, 坂田 武, 金井好克, 遠藤 仁: 尿酸トランスポーターURAT1細胞内結合タンパク質の同定. 第109回日本薬理学会関東部会, 東京, 平成15年10月4日.
44. Kanai, Y.: Membrane sorting of heterodimeric amino acid transporters. 第76回日本生化学学会大会, 平成15年10月17日.
45. Arthit Chairoungdua, Yoshikatsu Kanai, Hitoshi Endou: Amino acid transporters in malignanat tumors as acandidate target for anti-cancer therapy. 第76回日本生化学学会大会, 平成15年10月17日.
46. Shin Ho Jung, 武田理夫, 遠藤 仁: ヒト尿酸トランスポーター (URAT1) と尿酸排泄促進薬との相互作用. 第32回杏林医学会総会, 三鷹, 平成15年11月1日
47. Hassannejad Habib, 武田理夫, 遠藤 仁: ヒト有機カチオントランスポーター (hOCT) による抗不整脈薬輸送の解析. 第32回杏林医学会総会, 三鷹, 平成15年11月1日
48. 野城理絵, 安西尚彦, Ho Jung Shin, 平田 拓, 金井好克, 遠藤 仁: ヒトペプチドトランスポーターPEPT2細胞内結合蛋白質の同定. 第32回杏林医学会総会, 三鷹, 平成15年11月1日
49. 横山宏和, 安西尚彦, 平田 拓, 金井好克, 遠藤 仁: ラット腎に発現する新規有機アニオントランスポーターOAT8の同定. 第32回杏林医学会総会, 三鷹, 平成15年11月1日
50. 平田 拓, 安西尚彦, 横山宏和, 金井好克, 遠藤 仁: ラット腎近位尿細管管腔側膜に発現する新規硫酸抱合体トランスポーターの同定. 第32回杏

- 林医学会総会、三鷹、平成 15 年 11 月 1 日
51. Yue wei Li、Arthit Chairoungdua、入部雄司、金井好克、遠藤 仁：新規塩基性アミノ酸トランスポーターの同定と機能解析。第 32 回杏林医学会総会、三鷹、平成 15 年 11 月 1 日
52. Sirinun Nilwarangoon、細山田真、土岐昭依、遠藤 仁：マウス尿酸トランスポーターmURAT1 の機能と局在。第 32 回杏林医学会総会、三鷹、平成 15 年 11 月 1 日
53. 黒田琢磨、寺岡秀朗、小林ゆかり、寺戸雄一、金井好克、遠藤 仁、呉屋朝幸：
乳癌組織におけるアミノ酸トランスポーター発現に関する免疫組織化学的検討。
第 32 回杏林医学会総会、三鷹、平成 15 年 11 月 1 日
54. Kanai, Y. : Post-genome transporter research. 55th Annual Meeting of The Korean Society of Pharmacology. Muju, Korea, Nov. 3, 2003.
55. 遠藤 仁：大学における動物実験実習と代替法の取り組み。第 17 回日本動物実験代替法学会、神奈川、平成 15 年 11 月 7 日。
56. 坂田 武、宮崎博喜、安西尚彦、野城理絵、金井好克、遠藤 仁：新規腎臓尿酸トランスポーターURAT1 の単離とヒト薬物標的の代替法
57. 第 17 回日本動物実験代替法学会、相模原、平成 15 年 11 月 7 日
58. Endou, H. : Organic anion transporters (OATs). The American Society of Nephrology, Renal Week 2003, San Diego, U.S.A., Nov, 13, 2003.
59. Miyazaki H, Anzai N, Hirata H, Iribe Y, Nonoguchi H, Kanai Y, Tomita K and Endou H: Interaction of the PDZ Domain Protein PDZK1 with Urate/Anion Exchanger URAT1. Renal Week 2003, San Diego, Nov, 15, 2003.
60. Hirata T, Anzai N, Jutabha P, Enomoto A, Miyazaki H, Sakata T, Nonoguchi H, Kanai Y, Tomita K and Endou H: Cloning and Characterization of a Novel Organic Anion Transporter (OAT5): Apical Isoform of the Proximal Tubules in Rat Kidney. Renal Week 2003, San Diego, Nov, 16, 2003.
61. Chairoungdua, A., Babu, E., Kanai, Y. and Endou, H. : Identification of novel system L amino acid transporters structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters. 43rd Annual Meeting, The American Society for Cell Biology,

- San Francisco, U. S. A., Dec 15, 2003.
62. Sakamoto S, Kanai Y, Shigeta Y, Ito H and Endou, H.: A novel missense mutation of SLC7A9 frequent in Japanese Cystinuria population causing defect in sorting of the transporter protein. 43rd Annual Meeting, The American Society for Cell Biology, San Francisco, U. S. A., Dec 15, 2003.
63. 安西尚彦, 宮崎博喜, 平田拓, 榎本篤, 坂田武, 金井好克, 遠藤仁: 尿酸トランスポーターURAT1細胞内結合タンパク質の同定. 第26回日本分子生物学会, 神戸, 平成15年12月11日.
64. 武田理夫, Hasannejad Habib, 瀧健太郎, 榎本篤, 丹羽利充, 遠藤仁: ヒト有機アニオントランスポーターによる利尿薬の尿細管分泌機構. 第24回日本臨床薬理学会年会, 横浜, 平成15年12月11日.
65. Chairoungdua, A., Babu, E., Kanai, Y. and Endou, H.: Identification of novel system L amino acid transporters structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters. 43rd Annual Meeting, The American Society for Cell Biology, San Francisco, U. S. A., Dec 15, 2003.
66. 細山田 真: 生理的アプローチ: 尿酸トランスポーターを中心に. 第37回日本痛風核酸代謝学会総会, 米子, 平成16年2月6日.
67. 金井好克: アミノ酸輸送体を介するメチル水銀の吸収及び血液・組織関門透過と細胞毒性発現の分子機構の解析. 平成15年度重金属等の健康影響に関する総合研究研究班総会, 東京, 平成16年2月13日.
68. Kanai Y: Amino acid transporters in kidney. 5th Japan-Europe Nephrology Forum, Nakone, Mar 6, 2004.
69. Babu E, Chairoungdua A, Rafiqul I, 金井好克, 遠藤仁: 輸送系Lアミノ酸トランスポーターLAT3のモデル細胞としてのヒト肝細胞癌FLC4細胞の特性. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 平成16年3月8日.
70. 入部雄司, Chairoungdua A, 金井好克, 遠藤仁: CED98の細胞遊走における役割. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 平成16年3月8日.
71. Javan M, 金井好克, Chairoungdua A, 坂本信一, 遠藤仁: 腫瘍細胞株細胞膜上でのLAT1と関するタンパク質間相互作用の解析. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 平成16年3月8日.
72. 遠藤仁: 特別講演「トランスポーターと創薬」. 第77回日本薬理学会年会, 平成16年3月9日.

73. 金井好克, 遠藤 仁: シンポジウム「中性アミノ酸トランスポーターLATsと癌」, 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 平成16年3月9日.

第77回日本薬理学会年会, 大阪, 平成16年3月10日.

74. 宮崎博喜, 安西尚彦, Promsuk J, Ekaratanawong S, 野城理絵, 辛 祐禎, 坂田 武, 平田 拓, 金井好克, 遠藤 仁: 腎尿細管管腔膜の薬物トランスポーターOAT4の輸送メカニズム. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 平成16年3月10日.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予知を含む。)

該当なし。

75. Chairoungdua A, 金井好克, Babu E, 入部雄司, 高橋美知, 坂間慶子, 遠藤 仁: 輸送系L2の特性を示す中性アミノ酸トランスポーターの同定. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 平成16年3月10日.

76. Li YW, 金井好克, 入部雄司, 遠藤 仁: 胎盤型新規輸送系 γ +塩基性アミノ酸トランスポーターの同定. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 平成16年3月10日.

77. 坂田 武, 安西尚彦, 辛 祐禎, 野城理絵, 平田 拓, 横山宏和, 金井好克, 遠藤 仁: 有機カチオントランスポーターOCT1の新規遺伝子多型(NSPs)と輸送機能解析. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 平成16年3月10日.

78. 細山田真, 土岐昭依, Nilwarangkoon S, 遠藤 仁: マウス尿酸トランスポーター(mURAT1)発現の性差および年齢差.

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

大腸の前がん病変および腫瘍における遺伝子変化の解析に関する研究
分担研究者 若林 敬二 国立がんセンター研究所癌予防研究部・部長

研究要旨 ラットに、種々のヘテロサイクリックアミン(HCA)を「短期投与法（HCA2週＋高脂肪食のみ4週）」で投与すると、大腸粘膜の遺伝子発現は、投与開始後3週で肝発がん性を示すHCAにおいては全般的に低下していた。6週では、対照群に比較して有意に2倍以上発現が変動し、かつ大腸発がん物質特異的である遺伝子は少数であった。又、K-ras 遺伝子の変異を導入した培養細胞では、IL-1 β 及びLPS刺激によるiNOSの発現が昂進し、遺伝子変異の有無で大腸がんに影響する因子への反応性が変化する可能性を見出した。

A. 研究目的

加熱調理した肉や魚に含まれるヘテロサイクリックアミン（HCA）類を始めとして、環境中に存在する種々の変異原・がん原性物質はヒトのがんの原因物質である可能性が考えられる。しかしながら、その詳細については未だ不明な点が多い。又、これら化合物による傷害に対する個体の感受性あるいは抵抗性を規定している遺伝的な要因の本態も殆ど解明されていない。本研究は、環境中の種々の変異原・がん原性物質により誘発される動物の発がんモデルを用いて、①化合物特異的な遺伝子発現と遺伝子発現プロファイルの経時的変化、及び②その用量相関性、③発がん感受性の異なる動物系統における発現プロファイルの差異について GeneChip（Affymetrix）を用

いた包括的解析を行い、各化合物に特徴的な遺伝子発現プロファイルや遺伝子変異に関するデータを集積する。これにより、発がん重要な遺伝子変化の解明、既知化合物の低用量曝露による発がん性の予測、化合物曝露後の早期段階での遺伝的指標による発がん性予測が可能となる。さらに、遺伝情報に基づいたヒトの発がんリスク評価や、発がん感受性を規定する遺伝的要因の解明による発がん高危険度群の掌握が可能となる。

B. 研究方法

（1）種々のHCAの「短期投与法」による aberrant crypt foci (ACF)の誘発
長期連続投与で大腸発がん性が報告されているHCA類（大腸発がん物質）として、PhIP（飼料中の濃度、400 ppm）、IQ

(300 ppm), MeIQ (300 ppm), Glu-P-1 (500 ppm)を、大腸発がん性が報告されていない HCA 類 (非大腸発がん物質) として MeIQx (400 ppm), Trp-P-2 (100 ppm)を用いた。雄 F344 ラットに、「HCA 含有普通食を 2 週間+高脂肪食のみを 4 週間」の「短期投与方法」で投与し、大腸がんの前がん病変と推定される ACF の誘発性を検討した。

(2) 種々の HCA の「短期投与方法」により発現変動する遺伝子群の網羅的解析

種々の HCA を「短期投与方法」により投与し、投与開始後、3 及び 6 週において大腸粘膜を採取した。組織より RNA を採取し、cDNA に転写したものをビオチン標識して cRNA プローブを作成した。GeneChip (RG34A, Affymetrix 社)を用い、約 8800 個の遺伝子について、ゲノムワイドな網羅的遺伝子発現解析を行なった。対照群としては、普通食のみを投与したラットの大腸粘膜を解析した。各群 4 匹のラットを用いた。

(3) K-ras 遺伝子の変異を導入した培養細胞の IL-1 β 及び LPS 刺激による iNOS の発現の解析

アゾキシメタン誘発ラット大腸発がんでは、iNOS の発現上昇及び β -カテニンの異常が微小腫瘍の段階から高頻度に認められる。一方、その前段階と考えられる過形成性 aberrant crypt foci (ACFs) では、K-ras 遺伝子の変異が高頻度に起こっている。そこで、K-ras の変異が iNOS の発現にどのような影響を及ぼすかを培

養細胞系にて検討した。ラット小腸上皮細胞由来 IEC-6 細胞に K-ras 遺伝子のコドン 12 番の変異体 (K-ras^{Asp12}) を導入し、IL-1 β や LPS 刺激時の iNOS の発現への影響を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験については動物実験に関する規約を遵守し、実験に供する動物数も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用いる。動物の苦痛に対する配慮も十分に払う。今後、動物遺伝子からヒトの原因遺伝子に到達した場合には、倫理審査委員会の承認を得て実施する予定である。

C. 研究結果

(1) 種々のHCAの「短期投与方法」によるACFの誘発

PhIP, IQ, MeIQ, Glu-P-1, MeIQx, Trp-P-2を、「短期投与方法」によりラットに投与すると、1匹当たり各々2.7、1.8、5.6、1.8、1.6、0個のACFを誘発した。PhIP, IQ, MeIQ, Glu-P-1は長期連続投与により大腸がんを誘発することが報告されているが、MeIQx, Trp-P-2は大腸発がん性は報告されていない。MeIQx以外のHCAは、大腸発がん性とACF誘発性が一致した。しかし、MeIQxも「短期投与方法」を3回繰り返した後、高脂肪食のみを投与する「短期間欠投与方法」により、低率だが大腸がんを誘発すると報告されていることから(杉江ら、未発表)、今回、MeIQxがACF誘発性を示したのは「短