

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉山 雄一

平成16(2004)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 杉山雄一	1
---	---

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 杉山雄一	9
---	---

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 家入一郎	14
--	----

3. 細胞移植を用いた局所的投与における薬物動態解析 山下直秀	16
------------------------------------	----

4. 薬物トランスポーターの遺伝子発現多様性に関する研究 油谷浩幸	19
--------------------------------------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	24
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷り	27
------------------	----

研究要旨 重篤な薬物間相互作用が有名な cerivastatin と gemfibrozil の相互作用メカニズムについて検討し、主な原因が gemfibrozil のグルクロン酸抱合体による cerivastatin の OATP2 を介した肝取り込みの阻害および CYP2C8 を介した代謝阻害によるものである事を実証した。肝取り込みトランスポーターOATP2 のハプロタイプに基づいた in vitro 変異体の機能解析の結果、OATP2*15 の変異体では、野生型と比較して単位蛋白あたりの輸送能力(Vmax) の低下が観察され、昨年度共同研究者家入らが示した臨床での結果を支持する結果を得た。また、肝取り込みにおける個々のトランスポーターの寄与を決める目的で、OATP2, OATP8 の寄与をわけて評価する方法論を構築した。また、臨床において、(1)OATP-C*15 変異保有者で血中遊離型ビリルビンの有意な高値が観察され、プラバスタチンの肝クリアランスとの間に、有意な負の相関が認められた。(2)*15 変異を有する患者ではプラバスタチン服用後、血中コレステロール値は低下するが、その程度は、変異が無い群より弱い。(3)BCRP 遺伝子においても、胎盤や肝臓での発現に影響する変異が数種類存在すること、さらに、一部の変異は腸管での薬物輸送に関与することを示した。ヒト胎盤細胞(hPDMC)の培養上清は hUVEC の増殖を刺激し、ヒト血管新生因子(hVEGF)に生物活性があることが示された。また細胞移植はマウスの虚血を改善し、real-time RT-PCR で検索した hVEGF mRNA レベルから少なくとも移植後 7 日間は局所で hVEGF を産生していることが明らかとなった。薬物トランスポーターの遺伝子発現量の多様性について、不死化リンパ球および末梢血由来の RNA をマイクロアレイ解析することにより検討した。ABCA1 や ABCB1 遺伝子は発現値の CV 値が大きく発現の個人差が示唆された。

分担研究者

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）

油谷 浩幸（東京大学・国際・産学共同研究センター、教授）

OATP2 を基質とする薬剤に関しても簡便に検討できる in vitro 実験系を構築する事を目的として、特に頻度の高い 2 つの変異を対象として、ハプロタイプを考慮した 4 (2 × 2) 種類の in vitro 変異体発現細胞を構築し、速度論的な解析による機能比較を行った。ヒト肝臓の血管側には、OATP2 の他、類似のトランスポーターとして、OATP8 が発現している。これらの基質認識性は非常にオーバーラップしており、従って、ある基質の肝取り込み過程において、どちらのトランスポーターがどの程度重要であるかを定量的に決定する方法論は、それぞれのトランスポーターの機能変化が肝取り込み全体に与える影響を議論するうえで非常に重要であると考えられる。そこで、OATP2, OATP8 の寄与を定量的に明らかにする方法論の構築を試みた。

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ことを目的として、OATP-C 遺伝子多型と

A. 研究目的

1) 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

今年度は、実際に横紋筋融解症といった重篤で致命的な薬物間相互作用が原因で市場からの撤退を余儀なくされた、cerivastatin と gemfibrozil との相互作用メカニズムについて、トランスポーターの観点と、代謝酵素の観点の両面から、定量的な解析を行い、原因を解明する事を目的とした。

また、肝取り込みに重要な役割を果たすと考えられている OATP2 について、昨年度より共同研究者の家入ら（鳥取大学）が臨床試験において、OATP2*15 保有者で pravastatin の肝クリアランスが有意に低下する事を示してきており、本年度は、このメカニズムを明らかにし、さらに今後

ビリルビン値、プラバスタチンの効果との
相関、さらに排出トランスポーター

BCRP(breast cancer resistance protein)の遺伝
子多型について、胎盤・肝臓の発現量変化
および小腸吸収との相関をみた。

3) 細胞移植を用いた局所的投与における
薬物動態解析

胎盤由来間葉系細胞 (human
placenta-derived mesenchymal cells: hPDMC)
が多量のヒト血管内皮成長因子 (human
vascular endothelial growth factor: hVEGF) を
産生することを見い出していたが、hPDMC
から分泌されたhVEGFの生物活性、hPDMC
の細胞移植によるin vivoでの血管新生、
hPDMCから分泌されるhVEGFの薬物動態、
などについては不明である。本研究の目的
は、①hPDMCから産生されるhVEGFの生物
活性の検討、②虚血動物モデルでのhPDMC
の細胞移植による血流の改善、③細胞移植
されたhPDMCからhVEGFの
分泌動態、の3つである。

4) 薬物トランスポーターの遺伝子発現多
様性に関する研究

トランスポーター遺伝子の遺伝子多型と
血中薬剤濃度との関連についての報告が近
年散見されるが、遺伝子多型には蛋白質配
列の変異を伴わないものも多くその意義付
けはなかなか困難である。今年度は、ア
レル特異的な遺伝子発現の多様性の有無に
ついて解析することを目的とする。本年は
特に遺伝子発現量にどの程度のばらつきが
みられるかについて不死化リンパ球及び末
梢血検体を用いてマイクロアレイ解析を行
った。

B. 研究方法

1) 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

①cerivastatin(CER)と gemfibrozil(gem)の薬
物間相互作用メカニズムの解析

CER の ³H 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 gemfibrozil(gem)、その主代謝物
gemfibrozil-M3(gem-M3) ならびに
gemfibrozil のグルクロン酸抱合体(gem-glu)
による肝取り込み過程の阻害を試みた。ま
た、代謝阻害の影響を考慮するため、ヒト
肝臓ミクロソームや CYP2C8, CYP3A4 代謝
酵素発現系を用いて、gem, gem-M3, gem-glu
による代謝阻害実験を試みた。

②OATP2 多型変異体の in vitro 機能解析

野生型(OATP2*1a)、N130D(OATP2*1b)、

V174A(OATP2*5)、ならびに N130D &
V174A(OATP2*15)の4種類に関して、
OATP2 cDNA に site-directed mutagenesis の
手法を用いて変異を導入し、各発現ベク
ターを HEK293 細胞に安定発現させること
により変異体発現系を構築した。また、機
能比較は、Estradiol-17β-glucuronide(E₂17βG)
の輸送により行い、飽和性を観察した。ま
た、Western blot にて発現量を相対的に比較
し、その値で標準化することにより、単位
蛋白あたりの輸送能力を見積もり比較を行
った。

③OATP2, OATP8 の肝取り込みにおける定
量的な寄与率評価法の構築

OATP2, OATP8 安定発現 HEK293 細胞を
構築し、各種放射標識化合物の取り込みを
観察した。また、ヒト凍結肝細胞を用いて、
遊離細胞の状態では基質の取り込みを観察し
た。発現量は、抗 OATP2, OATP8 抗体を作
成し、細胞から crude membrane を調製し
Western blot 法でバンド濃度を相対的に比較
することで見積もった。

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

①OATP-C : ①-a. 健康成人 23 名を対象に、
OATP-C, MRP2, UGT1A1 遺伝子多型の肝で
のビリルビン輸送への影響を検討した。抱
合型および遊離型ビリルビン値を指標とし
た。①-b. プラバスタチンを服用する患者
(n=31)を対象に、服薬開始後 15 ヶ月時の血
中コレステロール低下の度合いと多型との
関連を評価した。

②BCRP : BCRP 遺伝子型が既知の健康成人
ボランティア 50 名を対象とし、基質薬物、
4-メチルウンベリフェロン(4MU)を投与し、
体内動態との関連を評価した。4MU および
硫酸抱合体濃度(4MUS)を測定し、体内動態
パラメータを算出した。

3) 細胞移植を用いた局所的投与における
薬物動態解析

① hPDMCから産生されるhVEGFの生物活
性の検討

hUVECは1 x 10⁶ cells/mLの密度で24穴の
カルチャーディッシュにまき、hPDMCの培
養上清をhUVECの培地に加え、ウエルごと
のサイミジン(³H-thymidine)の取り込みを
シンチレーターでカウントする。ELISAで
測定したhVEGFの値が生物学的活性と一
致するかを検討する。

②NOD/Shi-scidにおけるhPDMCの細胞移植
に関する検討

異種間細胞移植(Xenograft)が可能な、重
度免疫不全マウスのNOD/Shi-scidマウスを
日本クレアから購入する。片側の大腿動脈

を結紮して下肢虚血モデルを作製する。hPDMCを筋肉内に注射し、移植前、移植7日後、移植14日後の血流をレーザードップラーを用いて観察する。対照群としてはPBSのみ、およびヒト末梢血単核球を用い、hPDMCの細胞移植による虚血の改善度を測定する。

③細胞移植されたhPDMCからhVEGFの分泌動態

NOD/Shi-scid マウスに hPDMC を移植し、1 時間後、2 日後、7 日後にマウスを屠殺して注射部位の筋肉を取り出す。Trizol 法で総 RNA を抽出して、CYBR-Green を用いてヒト GAPDH mRNA の量と、ヒト VEGF mRNA の量をリアルタイム PCR 法で半定量する。ヒト GAPDH mRNA の量が移植した hPDMC の生存を反映し、ヒト VEGF mRNA が VEGF の分泌期間を反映するのでこれらを検討する。

4) 薬物トランスポーターの遺伝子発現多様性に関する研究

①ABC トランスポーター遺伝子の発現プロフィール

トランスポーター遺伝子の発現量にどの程度の個人差があるかどうかを検討するために、EBVを用いて不死化したリンパ球17株の発現プロフィールをCodeLinkヒト10Kアレイ (Amersham) を用いて1万遺伝子の発現プロフィールを解析した。蛍光強度の測定にはAgilent社の共焦点スキャナーを使用した。得られたシグナル値については、CV値 (=標準偏差/平均値) によりばらつきを評価した。

②末梢血におけるABC トランスポーター遺伝子の発現

13名の患者末梢血全血から抽出した全RNAから合成・Biotin標識したcRNAをアレイ解析に使用した。CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray (Amersham)を用いて2万遺伝子の発現を解析した。アレイ解析は上記と同様に行った。

(倫理面への配慮) 2)については、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承認を受けた。総ての研究は鳥取大学医学部倫理審査委員会においても、審査・承認を受けた後実施した。4)については、EBVにより不死化したリンパ球株は徳島大学医学部公衆衛生学教室より分与

を受けたもので連結不可能匿名化されているものである。

C. 研究結果

1) 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

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

gem およびその主代謝物である gem-M3, gem-glu の3物質に関して、トランスポーター並びに代謝酵素に対する阻害活性を測定した。ヒト凍結肝細胞を用いて CER の取り込みに対する阻害能を観察したところ gem-glu は、他の2分子に比べ、高い親和性で阻害することがわかった。ヒト肝ミクロソームを用いた代謝阻害実験の結果、gem-glu は、3分子種の中で最も強い阻害能を示した。さらに、cerivastatin が主に、CYP2C8, CYP3A4 により代謝されることから、CYP の寄与率を算出した結果、約60%に関して CYP2C8 が関与していることが明らかとなった。次に、recombinant CYP を用いた阻害実験を試みたところ、特に CYP2C8 において、gem-glu は、高親和性の阻害を示した。

②OATP2 多型変異体の *in vitro* 機能解析

OATP2*1a (野生型), OATP2*1b, OATP2*5 および OATP2*15 の多型変異体を安定発現させた HEK293 細胞を樹立した。その結果、各変異体とも膜上に発現が見られた。次に、E₂17βG の取り込みおよび速度論解析を試みたところ、親和性(K_m 値)は変異体間で差異は見られないものの、Western blot 法を用いてバンド濃度で相対的な発現量を補正した V_{max} 値が、OATP2*15 変異体においてのみ、野生型の約10%と低値を示した。

③OATP2, OATP8 の肝取り込みにおける定量的な寄与率評価法の構築

OATP2, OATP8 の寄与率評価法として2つの方法を用いた。1つは、estrone-3-sulfate (E-sul)を OATP2 の、cholecystokinin octapeptide (CCK-8)を OATP8 のそれぞれ選択的基質として用い、テスト化合物について、OATP2, OATP8 の発現系における取り込みクリアランスを観察し、それらに、選択的基質の取り込みから算出した輸送活性の比をかけることで、肝細胞における OATP2, OATP8 を介した取り込みクリアランスを計算で見積もることができるという考え方である。もう1つは、Western blot を用いて直接肝細胞と発現系の発現量の比較を行って比を算出し、上記と同様の検討を行う方法である。実際にこの方法を用いて、

E₂17βGおよびpitavastatinの肝細胞への取り込みにおける OATP2, OATP8 それぞれの寄与率の算定を行った結果、いずれの方法論でも、両化合物に関して OATP2 を介した取り込みが約 90%を占める事がわかった。

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

①OATP-C 遺伝子変異で、機能低下が報告される*15 変異を有する被検者では、有意な遊離型ビリルビン値の上昇が観察された。さらに、基質薬物であるプラバスタチンの肝クリアランスと遊離型ビリルビン値には有意な負の相関が見られた。プラバスタチン服用 15 ヶ月後の血中コレステロール値は、1 名を除き総ての患者で低下が見られたが、服用前の値からの低下率は、+0.99～-32.2%と患者間で大きな個人差が認められた。OATP2 遺伝子が野生型(*1a/*1a)患者の平均低下率が約 30%であったのに対し、*15 変異保有者での値は約 13%であった。

②BCRP 遺伝子の多型解析を行った結果、20 箇所の変異を同定した。その中で、421C>A (141Gln>Lys)がヒト胎盤での発現量を低下する傾向が見られた。臨床試験の結果、376C>T あるいは 421C>A 変異を有することで、高い 4MUS 濃度となった。また、肝や胎盤での発現レベルを検討中、対立遺伝子間で発現量の異なる検体が見られた。

3) 細胞移植を用いた局所的投与における薬物動態解析

①hPDMC から産生される hVEGF の生物活性の検討

培地にヒト胎盤細胞の培養上清を添加すると hUVEC の ³H-サイミジン取り込みは増加し、³H-サイミジンの取り込み値はリコンビナント hVEGF 添加とほぼ同等であり、ヒト胎盤細胞から産生される hVEGF は十分な生物活性を有すると結論された。

②NOD/Shi-scid における hPDMC の細胞移植に関する検討

片側の大腿動脈結紮後、患肢の血流を健側と比較したところ、hPDMC 投与群で前値 0.2108 ± 0.0077 (mean ± SE) に対し、7 日後は 0.5110 ± 0.056 に改善した (n=17)。PBS のみを投与した群では前値 0.2277 ± 0.012 で、7 日後は 0.3461 ± 0.0275 であった (n=13)。ヒト末梢血単核球投与群では前値 0.2071 ± 0.0093 で 7 日後は 0.3996 ± 0.0446 であった (n=17)。hPDMC 投与群は対照群に比較して有意に血流を改善した

(Mann-Whitney u-test, p<0.05) が、ヒト末梢血単核球投与群は対照群に比較して有意差を認めなかった。このようにヒト胎盤細胞は in vivo において血管新生作用を示

した。

③細胞移植された hPDMC から hVEGF の分泌動態

hPDMC 移植 1 時間後の筋肉内 hVEGF mRNA の発現の程度を 1.0 とした場合、2 日後は 0.11 ± 0.017 (n=3)、7 日後は 0.013 ± 0.00086 であった。非投与群では発現は認められなかった。この実験から移植された hPDMC は少なくとも 7 日感は投与部位で生存して hVEGF を産生していることが示唆された。

4) 薬物トランスポーターの遺伝子発現多様性に関する研究

①ABC トランスポーター遺伝子の発現プロフィール

22 種類の ABC トランスポーター遺伝子について遺伝子発現データが得られた。発現強度 (平均値) は 0.123 (ABCC2) から 24.426 (ABCE1) まで分布しており、CV 値も 0.151 (ABCB6: 最小値 1.164～最大値 2.177) から 0.557 (ABCA1: 最小値 0.073～最大値 0.676) や 0.657 (ABCB1, MDR1: 最小値 0.312～最大値 1.491) と遺伝子により変動幅が異なっていた。

②末梢血における ABC トランスポーター遺伝子の発現

13 名の患者末梢血の発現プロフィールを解析した。ABCB10, ABCB11, ABCE1 の 3 つの遺伝子は発現値の平均が 1 以上であり、かつ CV 値が 0.4 を越えている遺伝子であった。不死化リンパ球における発現値のばらつきの結果とは必ずしも一致していなかった。

D. 考察

1) 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

cerivastatin と gemfibrozil との相互作用について、トランスポーターと代謝の両面から検討を行った。その結果、gemfibrozil および gem-M3 のトランスポーター(OATP2) ならびに代謝酵素(CYP2C8, CYP3A4)の阻害能は小さく、かつ血中蛋白非結合型濃度からは相互作用を説明できないという結論となった。一方で、gem-glu がトランスポーター、代謝酵素、とりわけ CYP2C8 に対して強い阻害能を有することがわかった。一方で、cerivastatin の代謝に関わる主要な CYP は、2C8 であることが示された。また、gem-glu は、抱合体において予想されるように蛋白非結合型分率が高く、阻害に直接関与すると考えられる free 濃度は他の分子種に比較して高く、また、gem-glu は動物実験の結果から、肝臓内濃度は、血液中濃度と

比較して、数十倍の濃縮がかかることが報告されており、これを考慮すると、濃縮率を考慮した動態モデルから、血中濃度が数倍に上昇することが説明可能である結果を得た。今回おこなったような解析より、トランスポーターと代謝酵素のそれぞれがどの程度相互作用に関わるか定量的に評価する方法論を提示しており、今後、あらゆるケースにおいて適用可能な評価法であると考えている。

OATP2の遺伝子多型体の *in vitro* 機能比較より、OATP2*15において、単位発現量あたりの V_{max} 値が野生型と比較して、大幅に小さいことが示唆される結果を得た。この結果は、昨年度共同研究者の家入らによる臨床研究でのプラバスタチンの肝クリアランスの低下の度合いと定量的に一致していることから、おそらく OATP2*15 保有者においては、発現量は、野生型の保有者と差がないが、単位蛋白あたりのクリアランスの低下が、肝クリアランスの低下につながっているであろう結果を得た。

肝取り込みトランスポーター OATP2, OATP8 に関して、寄与率評価法を確立した。2種類の方法、すなわち、選択的基質の輸送をもとに輸送活性の比から発現量の差を補正する方法と、Western blot により直接的に発現量を比較する方法を用いて評価を行い、両者の結果が一致することから、これら評価法の妥当性が示されたと考えている。肝取り込み過程には、他にも OATP-B, OAT2 といった有機アニオンを認識するトランスポーター群が存在することから、より厳密な寄与率の評価が今後必要であると考え、詳細な検討を進めている。

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

昨年度の検討より、OATP-C 遺伝子多型、特に*15 変異による肝への基質取り込み能の低下が示唆された。本年度はこの仮説を実証した。*15 変異保有者で、遊離型ビリルビン値が高値であったこと、さらに、プラバスタチンによる血中コレステロール値への効果が不十分であったことは、いずれも、基質となる生体物質や医薬品の肝への取り込み能の低下を強く支持する結果と言える。BCRP に関する研究では、腸管での薬物吸収に寄与する多型の存在が確認されたが、と同時に、遺伝子発現に関する特殊な制御が観察された。一部のヒト組織検体では、片側アレルのみの発現が見られた。BCRP 遺伝子が imprinting gene であることが示唆される。仮に imprinting gene であれば、多型のみでは表現型を十分に説明でき

ないことになり、本領域の研究に新しい概念の導入が必要となる。現在、発現量や臨床試験での結果との関連を評価している。

3) 細胞移植を用いた局所的投与における薬物動態解析

虚血性疾患に対する血管新生促進療法としては、国内外のいくつかのグループが、数種類の異なった試みを行っている。それらは以下の通りに大別される。

- ① 血管新生促進因子を虚血部分に局所注入する方法。
- ② 血管新生促進因子遺伝子を組み込んだプラスミドあるいはアデノウイルスベクターを患部に局所投与する方法。
- ③ 自己骨髄単核球、あるいは自己末梢血単核球を虚血部に注射する細胞療法。

①では局所投与された血管新生因子は速やかに吸収されて体循環に拡散してしまうため、因子を局所に止めて血管新生を促進することは困難である。②のプラスミドでは遺伝子発現効率の低さが問題となり、アデノウイルスでは発現効率は高いものの、アデノウイルスベクターをヒトに投与することの安全性が問題視されている。③の細胞療法では、自己の末梢血単核球や骨髄単核球を採取するために全身麻酔やアフェレーシスが必要となるなど患者への侵襲(負担)が問題となる。特に難治性の虚血性疾患は高齢者に多いのでこの問題は重要である。以上の通り、患者への侵襲が少なく、安全かつ有効な新しい治療法の開発が望まれている。血管新生因子を産生する同種細胞の移植治療が可能になればこの問題は解決されるが、これまで安全で適切な細胞がなかった。私たちの見いだした胎盤細胞の移植はこの目的にかなっていると考えられる。局所での mRNA の発現は少なくとも投与後7日間認められた。今後血中での動態を解析する予定である。

4) 薬物トランスポーターの遺伝子発現多様性に関する研究

ABCB1 や ABCC2 のように既に DNA 多型との関連が報告されている遺伝子については、来年度以降タイピング情報との関連を検討する必要がある。研究班内の共同研究としてトランスポーター遺伝子のゲノム領域、とりわけプロモーター領域に存在する DNA 多型についてタイピングを行い、発現レベルとの相関、さらには薬物刺激による発現変動がどうかについて検討を進める予定である。本年はリンパ球あるいは末梢血を用いて解析を行ったが、腸管や肝臓などの薬物動態を制御する主要臓器や腫瘍細胞

などでの発現にもジェノタイプによる発現量の違いがあるかどうかについて検討を進める必要がある。トランスポーター遺伝子が多数のエクソンから構成されることからスプライシング変異が多様な転写産物をもたらす。次年度以降にはゲノムタイリングアレイを用いて変異転写産物の多様性についての検討も行う予定である。

E. 結論

cerivastatin と gemfibrozil の相互作用メカニズムは、主に gemfibrozil のグルクロン酸抱合体による OATP2 を介した肝取り込み過程の阻害と、CYP2C8 による代謝阻害の両方を考えることで説明可能であることが示唆される結果を得た。OATP2 の遺伝子多型体の *in vitro* 機能比較の結果、OATP2*15 に関して、単位蛋白量あたりの V_{max} 値が大幅に減少する事を見出し、これが臨床研究における肝クリアランスの減少を定量的に反映していることがわかった。肝取り込みにおける OATP2, OATP8 の寄与を分離評価する方法を見出し、モデル化合物 2 種 (E₂17βG, pitavastatin) について OATP2 が主とその肝取り込みに関わる事を明らかにした。また、2 種の方法を用いて検討した結果、両方の方法で共に一致する結果を得た。OATP-C は基質となる生体物質や医薬品の肝取り込みに重要な役割を果たしている。ビリルビンに関する疾患や HMG-CoA 還元酵素阻害剤に見る効果の個人差に関与すると考えられる。hPDMC は生物学的に活性のある hVEGF を産生し、虚血動物モデルへ細胞移植すると有意に血流を改善した。移植された細胞は少なくとも 7 日間は hVEGF を産生し続けた。ABCA1 や ABCB1 遺伝子は発現値にばらつきが高く、発現量に個人差のある可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shitara Y, Li AP, Kato Y, Lu C, Ito K, Itoh T, Sugiyama Y. Function of uptake transporters for taurocholate and estradiol-17β-D-glucuronide in cryopreserved human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokin*, 18, 33-41, 2003

Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem*, 278, 22644-22649, 2003

Ito T, Saito Y, Shirao K, Minami H, Ohtsu A,

Yoshida T, Saijo N, Suzuki H, Sugiyama Y, Ozawa S, Sawada J. Eight novel single nucleotide polymorphisms in ABCG2/BCRP in Japanese cancer patients administered irinotecan. *Drug Metab Pharmacokin*, 18, 212-217, 2003

Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, Sugiyama Y. Functional characterization of rat brain specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: High affinity transporter for thyroxine. *J Biol Chem*, 278, 43489-43495, 2003

Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev*, 55, 425-461, 2003

倉智嘉久, 杉山雄一 上皮組織ベクトル輸送の分子基盤と機能制御 序論 「蛋白質・核酸・酵素」, 48(2), 101-104, 2003

伊藤晃成, 鈴木洋史, 堀江利治, 杉山雄一 上皮組織ベクトル輸送の分子基盤と機能制御 薬物トランスポーターの局在とベクトル輸送 「蛋白質・核酸・酵素」, 48(2), 122-132, 2003

吉末訓弘, 楠原洋之, 杉山雄一 トランスポーター研究に基づく医薬品開発 「バイオサイエンスとインダストリー」, 61(7), 455-460, 2003

楠原洋之, 杉山雄一 Pharmacogenomics 「現代医療」, 35(7), 1532-1540, 2003

前田和哉, 神原美由紀, 平野雅, 杉山雄一 ヒト肝臓に高発現する OATP2, OATP8 の機能特性の解析と肝取り込み過程における寄与率の評価 「Progress in Drug Delivery System」, 12, 33-42, 2003

平野雅, 前田和哉, 設楽悦久, 杉山雄一 新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬ピタバスタチンのヒト肝選択的な分布メカニズムの解析 —OATP ファミリーの関与— 「薬理と治療」, 31 suppl., S-81-S-84, 2003

岩井めぐみ, 鈴木洋史, 西里洋平, 家入一郎, 大坪健司, 杉山雄一 ヒト Organic Anion Transporting Polypeptide 2 (OATP2) 遺伝的多型変異体の *in vitro* 輸送機能の解析 「薬理と治療」, 31 suppl., S-101-S-104, 2003

岩井めぐみ, 前田和哉, 杉山雄一 遺伝子多型と抗がん剤の薬物動態 (特集: 癌ゲノム薬理学) 「血液・免疫・腫瘍」, 8(4), 26-32, 2003

Takane H, Ieiri I and Otsubo K. Genetic polymorphism of organic anion and cation transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy. *Curr Pharmacogenomics*, 1, 245-57, 2004

Ieiri I, Takane H and Otsubo K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin Pharmacokinetics*, in press, 2004

- Zhang X, Nakaoka T, Nishishita T, Watanabe N, Igura K, Shinomiya K, Takahashi TA, Yamashita N. Efficient adeno- associated virus mediated gene expression in human placenta-derived mesenchymal cells. *Microbiology and Immunology.*, 47, 109-116, 2003
- Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cell. *Blood*, 101, 3581-3589, 2003
- Sato K, Yamashita N, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relaps. *Immunity*, 18, 367-379, 2003
- Watanabe T, Akishita M., Nakaoka T., Kozaki K., Miyahara Y., He H., Ohike Y., Ogita T., Inoue S., Muramatsu M., Yamashita N., Ouchi Y. Estrogen receptor beta mediates the inhibitory effect of estradiol on vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovascular Research*, 59, 734-744, 2003
- Nagayama H, Sato K, Morishita M, Uchimaru K, Oyaizu N, Inazawa T, Yamasaki T, Enomoto M, Nakaoka T, Nakamura T, Maekawa T, Yamamoto A, Shimada S, Saida T, Kawakami Y, Asano S, Tani K, Takahashi TA, Yamashita N. Results of phase I clinical study using autologous tumor-lysate pulsed monocyte-derived mature dendritic cell vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2. *Melanoma Research*, 13, 1-10, 2003
- Watanabe T, Akishita M, He H, Miyahara Y, Nagano K, Nakaoka T, Yamashita N, Kozaki K, Ouchi Y. 17beta-Estradiol inhibits cardiac fibroblast growth through both subtypes of estrogen receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 311, 454-9, 2003
- Morishita M, Uchimaru K, Sato K, Yamashita S, Kanematsu T, Yamashita N. Thyroglobulin-pulsed human monocyte-derived dendritic cells induce CD4⁺T cell activation. *International Journal of Molecular Medicine*, 13, 33-39, 2004
- T Nishishita, K Ouchi, Z Xiaohong, T Inazawa, K Yoshiura, T Nakaoka, N Watanabe, K Igura, T A. Takahashi and N Yamashita. A potential pro-angiogenic cell therapy for ischemic disease with human placenta-derived mesenchymal cells., in press, 2004
- Ge X, Tsutsumi S, Aburatani H, Iwata S. Reducing false positives in molecular pattern recognition. *Genome Informatics* 14:34-43, 2003
- Satoh T, Baba M, Nakatsuka D, Ishikawa Y, Aburatani H, Furuta K, Ishikawa T, Hatanaka H, Suzuki M, Watanabe Y. Role of heme oxygenase-1 protein in the neuroprotective effects of cyclopentenone prostaglandin derivatives under oxidative stress. *Eur J Neurosci.* 17(11): 2249-2255. 2003
- Shimizu H, Taniguchi H, Hippo Y, Hayashizaki Y, Aburatani H, Ishikawa T. Characterization of the mouse Abcc12 gene and its transcript encoding an ATP-binding cassette transporter, an orthologue of human ABCC12. *Gene.* 310:17-28. 2003
- Fujiwara Y, Yokoyama M, Sawada R, Seyama Y, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Hanaka S, Itakura H, Matsumoto A. Analysis of comprehensive effects of polyunsaturated fatty acid on mRNA expression using a GeneChip. *J Nutr Sci Vitaminol*, 49: 125-132 2003
- Kano M, Nishimura K, Ishikawa S, Tsutsumi S, Hirota K, Hirose M, Aburatani H. Expression Imbalance Map: A New Visualization Method for Detection of mRNA Expression Imbalance Regions. *Physiol Genomics.* 13: 31-46, 2003
- 油谷浩幸, 平井久丸, 杉山雄一 ポストゲノム時代の医療 (鼎談) 現代医療 35(7): 1428-1443, 2003
- 油谷浩幸 ゲノム創薬とプロテオミクス Medical Briefs in Cancer 8(3):10-11, 2003

2. 学会発表

- Yuichi Sugiyama "ADME/PK and toxicology data for early attrition of drug candidates in the drug discovery stage to reduce R&D costs effect and side effect"
- CBI's Tracked Forum on Predictive ADME/Tox (招待講演) Pennsylvania, USA, 2003.2
- 前田和哉, 神原美由紀, 平野雅, 杉山雄一 ヒト肝臓に高発現するOATP2, OATP8の機能特性の解析と肝取り込み過程における寄与率の評価
- 第12回DDSカンファレンス 静岡 2003.5
- 平野雅, 前田和哉, 設楽悦久, 杉山雄一 新規HMG-CoA還元酵素阻害薬ピタバスタチンのヒト肝選択的な分布メカニズムの解析 —OATPファミリーの関与—
- 第11回肝病態生理研究会 福岡 2003.5
- 岩井めぐみ, 鈴木洋史, 西里洋平, 家入一郎, 大坪健司, 杉山雄一 ヒト Organic Anion Transporting Polypeptide 2 (OATP2) 遺伝的多型変異体のin vitro輸送機能の解析
- 第11回肝病態生理研究会 福岡 2003.5
- Yuichi Sugiyama "Prediction of transporter-based drug interactions; In vitro-in vivo correlations"
- 6th International Conference on Drug-Drug Interactions (招待講演), California, USA, 2003.6
- 前田和哉, 神原美由紀, 平野雅, 杉山雄一 有機アニオン類の肝指向性を支配するトランスポーターOATP2, OATP8の機能解析
- 第19回日本DDS学会 京都 2003.6
- 平野雅, 前田和哉, 設楽悦久, 杉山雄一

新規HMG-CoA還元酵素阻害薬ピタバスタチンの肝選択的分布におけるトランスポーター、OATPファミリーの関与

第19回日本DDS学会 京都 2003.6

Kazuya Maeda, Miyuki Kambara, Masaru Hirano and Yuichi Sugiyama

Functional Analysis of OATP2 (OATP-C/SLC21A6) and OATP8 (SLC21A8): Their contributions to hepatic uptake clearance

Gordon Conference (Drug Metabolism) New Hampshire, USA 2003.7

Yuichi Sugiyama "Integrated use of single and double-transfected MDCK cells; Utility in predicting transporter-mediated drug clearance and drug interactions in vivo"

Gordon Conference (Drug Metabolism) (招待講演) New Hampshire, USA 2003.7

岩井めぐみ、鈴木洋史、西里洋平、家入一郎、大坪健司、杉山雄一 ヒト Organic Anion Transporting Polypeptide 2 (OATP2/SLC21A6) 遺伝的多型変異体の比較解析: ヒト in vivo データとの定量的相関

第10回肝細胞研究会, 東京 2003.7

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 輸送特性の速度論解析

第10回肝細胞研究会, 東京 2003.7

Kazuya Maeda, Miyuki Kambara, Masaru Hirano and Yuichi Sugiyama

EVALUATION OF THE CONTRIBUTION OF ORGANIC ANION TRANSPORTING POLYPEPTIDES (OATP) TO OVERALL HEPATIC UPTAKE IN HUMAN LIVER

12th North American ISSX Meeting, Rhode Island, USA 2003.10

平野雅、前田和哉、設楽悦久、杉山雄一 ピタバスタチンの肝取り込み過程における OATP ファミリーの関与および寄与率の評価

第18回日本薬物動態学会年会 札幌 2003.10

岩井めぐみ、広内幹和、鈴木洋史、西里洋平、井戸田昌也、小澤正吾、澤田純一、家入一郎、大坪健司、杉山雄一 ヒト肝臓における取り込み・排泄に関与するトランスポーターの遺伝的多型による機能変化と臨床における意義

第18回日本薬物動態学会年会(シンポジウム) 札幌 2003.10

Yuichi Sugiyama "Drug Transporters and their role in drug disposition"

2003 AAPS Annual Meeting and Exposition (招待講演), Salt Lake City, Utah, USA, 2003.10

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 cerivastatin の肝臓の膜透過過程における輸送機構の解明

第17回日本実験動物代替法学会 神奈川 2003.11

前田和哉、平野雅、神原美由紀、杉山雄一

ヒト肝臓の血中からの取り込みに関わる各トランスポーターの寄与率の評価法の検討

日本薬学会関東支部第28回学術講演会 東京 2003.12

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

ヒト肝臓における膜透過過程を模倣したトランスポーター共発現系を用いた statin 類の経細胞輸送機構の解析

日本薬学会関東支部第28回学術講演会 東京 2003.12

Yuichi Sugiyama "Prediction of transporter-based drug interactions: In vitro-in vivo correlations"

Drug Discovery and Development Summit-2003; Novel Concepts and Technologies to Accelerate Drug Development (招待講演), Hawaii, USA, 2003.12

Kazuya Maeda, Masaru Hirano, Miyuki Kambara, and Yuichi Sugiyama

STRATEGIES FOR EVALUATING THE CONTRIBUTION OF ORGANIC ANION TRANSPORTING POLYPEPTIDE (OATP) FAMILY TRANSPORTERS TO HUMAN HEPATIC UPTAKE

MMT3D Tokyo 2004.2

小林大介、家入一郎、高根 浩、木村美由紀、紀川純三、陶山比奈子、入江 伸、浦江明憲、鈴木洋史、楠原洋之、寺川直樹、美根和典、大坪健司、杉山雄一 BCRP 遺伝子多型解析と機能評価。

第18回日本薬物動態学会, 札幌, 2003.10

家入一郎、廣田 豪、鈴木洋史、木村美由紀、川端 清、樋口 駿、大坪健司、杉山雄一 肝におけるビリルビン輸送活性と MRP2、OATP-C 遺伝子多型。

第42回中四国薬学会, 高松, 2003.11

油谷浩幸 BioEXPO セミナー (東京) 5/15 遺伝子発現解析を用いた創薬研究への展開

油谷浩幸 Amersham Biosciences Symposium 2003 (東京・大阪) 6/18・19 トランスクリプトーム解析による疾病解析の現状

油谷浩幸 第5回国際ゲノム会議 (横浜) 6/27 Transcriptome to Integrated Biology

油谷浩幸 第14回 南大阪がん研究会 (近畿大) 10/16 マイクロアレイ解析の疾患医療への応用

油谷浩幸 関東腎研究会 (東京) 1/17 Clinical genomics: マイクロアレイ解析の医療への応用

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 薬物間相互作用が原因で市場から撤退を余儀なくされた cerivastatin と gemfibrozil の相互作用メカニズムについて検討し、主な原因が gemfibrozil のグルクロン酸抱合体による cerivastatin の OATP2 を介した肝取り込みの阻害および CYP2C8 を介した代謝阻害によるものである事を実証した。肝取り込みトランスポーター OATP2 のハプロタイプに基づいた in vitro 変異体の機能解析の結果、日本人に 15%程度の頻度で見られる OATP2*15 の変異体の発現系では、野生型と比較して単位蛋白あたりの輸送能力(Vmax)の低下が観察され、昨年度共同研究者家入らが示した臨床での結果を支持する結果を得た。また、肝取り込みにおける個々のトランスポーターの寄与を決める目的で、OATP2, OATP8 の寄与をわけて評価する方法論を構築した。

A.研究目的

昨年は、肝取り込みトランスポーター OATP(organic anion transporting polypeptide) 2 に焦点をあて、cerivastatin と cyclosporin A の相互作用が、OATP2 を介した肝取り込み過程にある事を実証したが、今年度は、昨年度に引き続き、実際に横紋筋融解症といった重篤で致死的な薬物間相互作用が原因で市場からの撤退を余儀なくされた、cerivastatin と gemfibrozil との相互作用メカニズムについて、トランスポーターの観点と、代謝酵素の観点の両面から、定量的な解析を行い、原因を解明する事を目的とした。

また、肝取り込みに重要な役割を果たすと考えられている OATP2 について、いくつか遺伝子多型が報告されてきている。一方、本研究でも昨年度より共同研究者の家入ら（鳥取大学）が臨床試験において、OATP2 の遺伝的多型によって pravastatin の肝クリアランスが有意に低下する事を示してきており、臨床においても OATP2 の変異がインパクトを持つことが明らかとされてきた。このメカニズムを明らかにし、さらに今後 OATP2 を基質とする薬剤に関して、変異がどのように薬物動態に影響するかを検討できる in vitro 実験系を構築する事を目的として、現在報告されている多型の中で、特に頻度の高い2つの変異を対象として、かつ日本人ではこの2つの変異が高頻度にリンクした OATP2*15 アレルが見られるので、ハプロタイプを考慮した4（2×2）種類の in vitro 変異体発現細胞を構築し、速度論

的な解析による機能比較を行った。

一方、ヒト肝臓の血管側には、OATP2 の他、比較的肝臓特異的に発現する類似のトランスポーターとして、OATP8 が発現している。これらの基質認識性は非常にオーバーラップしており、従って、ある基質の肝取り込み過程において、どちらのトランスポーターがどの程度重要であるかを定量的に決定する方法論は、それぞれのトランスポーターの機能変化が肝取り込み全体に与える影響を議論するうえで非常に重要であると考えられる。そこで、OATP2, OATP8 の寄与を定量的に明らかにする方法論の構築を行い、モデル化合物2種を用いて、寄与の見積もりを試みた。

B.研究方法

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

CER の ³H 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 gemfibrozil(gem)、その主代謝物 gemfibrozil-M3(gem-M3) ならびに gemfibrozil のグルクロン酸抱合体(gem-glu) による肝取り込み過程の阻害を試みた。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や CYP2C8, CYP3A4 代謝酵素発現系を用いて、gem, gem-M3, gem-glu による代謝阻害実験を試みた。

2) OATP2 多型変異体の in vitro 機能解析 OATP2 について特に頻度が高い変異とし

て報告されている、N130D および V174A に着目した解析を行うため、野生型(OATP2*1a)、N130D(OATP2*1b)、V174A(OATP2*5)、ならびに N130D & V174A(OATP2*15)の4種類に関して、OATP2 cDNA に site-directed mutagenesis の手法を用いて変異を導入し、各発現ベクターを HEK293 細胞に安定発現させることにより変異体発現系を構築した。また、機能比較は、Estradiol-17 β -glucuronide(E₂17 β G)の輸送により行い、飽和性を観察した。また、Western blot にて発現量を相対的に比較し、その値で標準化することにより、単位蛋白あたりの輸送能力を見積もり比較を行った。

3) OATP2, OATP8 の肝取り込みにおける定量的な寄与率評価法の構築

OATP2, OATP8 安定発現 HEK293 細胞を構築し、各種放射標識化合物の取り込みを観察した。また、ヒト凍結肝細胞を用いて、遊離細胞の状態では基質の取り込みを観察した。発現量は、抗 OATP2, OATP8 抗体を作成し、細胞から crude membrane を調製し Western blot 法でバンド濃度を相対的に比較することで見積もった。

C. 研究結果

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

gem およびその主代謝物である gem-M3, gem-glu の3物質に関して、トランスポーター並びに代謝酵素に対する阻害活性を測定した。まず、ヒト凍結肝細胞を用いて CER の取り込みに対する、gem, gem-M3, gem-glu の阻害能を観察したところ、gem は、 $K_i=72.5\mu\text{M}$ で CER の取り込みを阻害したのに対して、gem-M3 は、より低親和性の阻害しかみられなかった。一方、gem-glu は、 $K_i=18.3\mu\text{M}$ と高い親和性で阻害することがわかった。ヒト肝ミクロソームを用いた代謝阻害実験の結果、gem-glu は、3分子種の中で最も強い阻害能を示した。さらに、cerivastatin が主に、CYP2C8, CYP3A4 により代謝されることから、CYP の寄与率を算出する目的で、CYP2C8 機能中和抗体並びに ketoconazole(CYP3A4 阻害剤として)を用いた検討を行った結果、約 60% に関して CYP2C8 が関与していることが明らかとなった。次に、recombinant CYP を用いた阻害実験を試みたところ、特に CYP2C8 において、gem-glu は、 $IC_{50}=3.46\mu\text{M}$ と高親和性の阻害を示した。さらに、in vivo における定量的な阻害能力を見積もるために、ヒト血

清を用いて、血中蛋白非結合型分率を見積もったところ、gem, gem-M3 は、0.006, 0.012 と低い値を示したのに対し、gem-glu は、最も高い値(0.115)を示した

2) OATP2 多型変異体の in vitro 機能解析

OATP2*1a(野生型), OATP2*1b, OATP2*5 および OATP2*15 の4種類の多型変異体を安定発現させた HEK293 細胞を樹立した。免疫染色法を用いて、各変異体の発現を観察した結果、いずれにおいても膜上に発現が見られ、また、MDCKII 細胞に発現させた場合も、いずれも basal 側の膜上に強い蛍光が見られた。また、表面ビオチン化法により、表面に発現するトランスポーターだけをラベルして Western blot したところ、野生型とほぼ同程度表面に発現していることも確認された。次に、E₂17 β G の取り込みおよび速度論解析を試みた。その結果、親和性(K_m 値)は変異体間で差異は見られないものの、Western blot 法を用いてバンド濃度で相対的な発現量を補正した V_{max} 値が、OATP2*15 変異体においてのみ、野生型の約 10% と低値を示した。なお、クローン化による影響である事を排除するため OATP2*15 安定発現系のほかのクローンを用いて同様の検討を行った結果、別のクローンでも同様の結果が得られた。

3) OATP2, OATP8 の肝取り込みにおける定量的な寄与率評価法の構築

OATP2, OATP8 の寄与率評価法として2つの方法を用いた。1つは、estrone-3-sulfate(E-sul)を OATP2 の、cholecystokinin octapeptide(CCK-8)を OATP8 のそれぞれ選択的基質として用い、それらの OATP2, OATP8 発現系における取り込みクリアランスと、ヒト肝細胞における取り込みクリアランスを比較することで、両者の相対的な輸送活性の比を算出することができる。すなわちテスト化合物に関して、OATP2, OATP8 の発現系における取り込みクリアランスを算出し、それらに、選択的基質の取り込みから算出した比をかけることで、肝細胞における OATP2, OATP8 を介した取り込みクリアランスを計算で見積もることができるという考え方である。実際にこの方法を用いて、テスト化合物として、E₂17 β G および pitavastatin の肝細胞への取り込みにおける OATP2, OATP8 それぞれの寄与率の算定を行った。その結果、両化合物に関して、OATP2 を介した取り込みが約 90% を占める事がわかった。なお、テスト化合物の肝細胞への取り込みクリアランス

は、発現系から見積もった OATP2, OATP8 を介した取り込みの和でほぼ説明できることから、両化合物の取り込みは、主に OATP2, 一部がほぼ OATP8 により説明できることが示唆された。一方、もう1つの方法として、Western blot を用いて直接肝細胞と発現系の発現量の比較を行って比を算出し、上記と同様の検討を行った結果、この方法からもほぼ同様の結論が導かれ、これら方法論の妥当性が示された。

D. 考察

cerivastatin と gemfibrozil との相互作用について、トランスポーターと代謝の両面から検討を行った。当初、gemfibrozil がカルボン酸を有し、アニオン性であること、またその主代謝物 (gem-M3, ジカルボン酸) の薬物濃度が長時間持続して維持される事が臨床データよりわかっていたことから、当初、cyclosporin A と cerivastatin の相互作用と同様に OATP2 を介した肝取り込み過程にあると予想して研究を行った。その結果、予想に反して、gemfibrozil および gem-M3 のトランスポーター(OATP2)ならびに代謝酵素(CYP2C8, CYP3A4)の阻害能は小さく、かつ血中蛋白非結合型濃度からは相互作用を説明できないという結論となった。一方で、gemfibrozil は、グルクロン酸抱合もされることがわかっており、その阻害能も観察した結果、gem-glu が予想に反して、トランスポーター、代謝酵素、とりわけ CYP2C8 に対して強い阻害能を有することがわかった。一方で、cerivastatin の代謝に関わる主要な CYP は、2C8 であることが示された。また、gem-glu は、抱合体において予想されるように蛋白非結合型分率が高く、阻害に直接関与すると考えられる free 濃度は他の分子種に比較して高いものと予想される。また、gem-glu は動物実験の結果から、肝臓内濃度は、血液中濃度と比較して、数十倍の濃縮がかかることが報告されており、これを考慮すると、gem-glu の肝臓内濃度は代謝酵素の阻害定数と比較して有意に高く、濃縮率を考慮した動態モデルから、血中濃度が数倍に上昇することが説明可能である結果を得た。今回の相互作用は、トランスポーターOATP2を介した cerivastatin の肝取り込み阻害と、CYP2C8 による代謝酵素の阻害の両方が関与することがわかった。今回おこなったような解析より、トランスポーターと代謝酵素のそれぞれがどの程度相互作用に関わるか定量的に評価する方法論を提示しており、今後、あらゆるケースにおいて適用可能な評価法であると考えてい

る。

OATP2 の遺伝子多型体の *in vitro* 機能比較より、OATP2*15 において、単位発現量あたりの V_{max} 値が野生型と比較して、大幅に小さいことが示唆される結果を得た。この結果は、昨年度共同研究者の家入らによる臨床研究でのプラバスタチンの肝クリアランスの低下の度合いと定量的に一致していることから、おそらく OATP2*15 保有者においては、発現量は、野生型の保有者と差がないが、単位蛋白あたりのクリアランスの低下が、肝クリアランスの低下につながっているであろう結果を得た。また、興味深いことに、1つ SNPs をもつ、OATP2*1b や OATP2*5 においては、有意な機能低下が観察されず、2つの SNPs を併せ持つ OATP2*15 になって初めて大きな機能低下が見られたことから、ハプロタイプを考慮した *in vitro* 解析が重要であることが示唆された。OATP2*5 は、日本人では連鎖不平衡のため見られていない一方、欧米人では、OATP2*15 が見られていないといった人種差があることから、今後、OATP2*5 の臨床における意義を明らかにするためには、欧米における臨床研究の結果が必須であると思われる。

肝取り込みトランスポーターOATP2, OATP8 に関して、寄与率評価法を確立した。2種類の方法、すなわち、選択的基質の輸送をもとに輸送活性の比から発現量の差を補正する方法と、Western blot により直接的に発現量を比較する方法を用いて評価を行い、両者の結果が一致することから、これら評価法の妥当性が示されたと考えている。今回用いたモデル化合物2種に関しては、OATP2, OATP8 両トランスポーターの寄与を考慮すれば、肝細胞における取り込みはほぼ説明できるような結果を得ている。しかし、肝取り込み過程には、他にも OATP-B, OAT2 といった有機アニオンを認識するトランスポーター群が存在することから、より厳密な寄与率の評価が今後必要であると考え、詳細な検討を進めている。また、化合物によっては、OATP2 だけがメジャーに働かないような事例も現在観察されており、必ずしも全ての有機アニオンが OATP2 により主に取り込まれているわけではない事を示すべく、検討を行っている。

E. 結論

cerivastatin と gemfibrozil の相互作用メカニズムは、主に gemfibrozil のグルクロン酸抱合体による OATP2 を介した肝取り込み過程の阻害と、CYP2C8 による代謝阻害の

両方を考えることで説明可能であることが示唆される結果を得た。

OATP2の遺伝子多型体の *in vitro* 機能比較の結果、OATP2*15 に関して、単位蛋白量あたりの V_{max} 値が大幅に減少する事を見出し、これが臨床研究における肝クリアランスの減少を定量的に反映していることがわかった。

肝取り込みにおける OATP2, OATP8 の寄与を分離評価する方法を見出し、モデル化合物 2 種 (E_2 17 β G, pitavastatin) について OATP2 が主にその肝取り込みに関わる事を明らかにした。また、2 種の方法を用いて検討した結果、両方の方法で共に一致する結果を得た。

F.健康危険情報 なし

G.研究発表

1. 論文発表

Shitara Y, Li AP, Kato Y, Lu C, Ito K, Itoh T, Sugiyama Y. Function of uptake transporters for taurocholate and estradiol-17 β -D-glucuronide in cryopreserved human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokin*, 18, 33-41, 2003

Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem*, 278, 22644-22649, 2003

Itoda M, Saito Y, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Suzuki H, Sugiyama Y, Ozawa S, Sawada J. Eight novel single nucleotide polymorphisms in ABCG2/BCRP in Japanese cancer patients administered irinotecan. *Drug Metab Pharmacokin*, 18, 212-217, 2003

Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, Sugiyama Y. Functional characterization of rat brain specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: High affinity transporter for thyroxine. *J Biol Chem*, 278, 43489-43495, 2003

Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev*, 55, 425-461, 2003

倉智嘉久, 杉山雄一 上皮組織ベクトル輸送の分子基盤と機能制御 序論 「蛋白質・核酸・酵素」, 48(2), 101-104, 2003

伊藤晃成, 鈴木洋史, 堀江利治, 杉山雄一 上皮組織ベクトル輸送の分子基盤と機能制御 薬物トランスポーターの局在とベクトル輸送 「蛋白質・核酸・酵素」, 48(2), 122-132, 2003

吉末訓弘, 楠原洋之, 杉山雄一 トランスポーター研究に基づく医薬品開発 「バイオサイエンスとインダストリー」, 61(7), 455-460, 2003

楠原洋之, 杉山雄一 Pharmacogenomics 「現代医療」, 35(7), 1532-1540, 2003

前田和哉, 神原美由紀, 平野雅, 杉山雄一 ヒト肝臓に高発現する OATP2, OATP8 の機能特性の解析と肝取り込み過程における寄与率の評価 「Progress in Drug Delivery System」, 12, 33-42, 2003

平野雅, 前田和哉, 設楽悦久, 杉山雄一 新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬ピタバスタチンのヒト肝選択的な分布メカニズムの解析 —OATPファミリーの関与— 「薬理と治療」, 31 suppl., S-81-S-84, 2003

岩井めぐみ, 鈴木洋史, 西里洋平, 家入一郎, 大坪健司, 杉山雄一 ヒト Organic Anion Transporting Polypeptide 2 (OATP2) 遺伝的多型変異体の *in vitro* 輸送機能の解析 「薬理と治療」, 31 suppl., S-101-S-104, 2003

岩井めぐみ, 前田和哉, 杉山雄一 遺伝子多型と抗がん剤の薬物動態 (特集: 癌ゲノム薬理学) 「血液・免疫・腫瘍」, 8(4), 26-32, 2003

2. 学会発表

Yuichi Sugiyama "ADME/PK and toxicology data for early attrition of drug candidates in the drug discovery stage to reduce R&D costs effect and side effect"

CBI's Tracked Forum on Predictive ADME/Tox (招待講演) Pennsylvania, USA, 2003.2

前田和哉, 神原美由紀, 平野雅, 杉山雄一 ヒト肝臓に高発現する OATP2, OATP8 の機能特性の解析と肝取り込み過程における寄与率の評価

第12回DDSカンファレンス 静岡 2003.5

平野雅, 前田和哉, 設楽悦久, 杉山雄一 新規 HMG-CoA還元酵素阻害薬ピタバスタチンのヒト肝選択的な分布メカニズムの解析 —OATPファミリーの関与—

第11回肝病態生理研究会 福岡 2003.5

岩井めぐみ, 鈴木洋史, 西里洋平, 家入一郎, 大坪健司, 杉山雄一 ヒト Organic Anion Transporting Polypeptide 2 (OATP2) 遺伝的多型変異体の *in vitro* 輸送機能の解析

第11回肝病態生理研究会 福岡 2003.5

Yuichi Sugiyama "Prediction of transporter-based drug interactions; In vitro-in vivo correlations"

6th International Conference on Drug-Drug Interactions (招待講演), California, USA, 2003.6

前田和哉, 神原美由紀, 平野雅, 杉山雄一 有機アニオン類の肝指向性を支配するトランスポーター OATP2, OATP8 の機能解析

第19回日本DDS学会 京都 2003.6

平野雅, 前田和哉, 設楽悦久, 杉山雄一

新規 HMG-CoA還元酵素阻害薬ピタバスタチンの肝

選択的分布におけるトランスポーター、OATPファミリーの関与

第19回日本DDS学会 京都 2003.6

Kazuya Maeda, Miyuki Kambara, Masaru Hirano and Yuichi Sugiyama

Functional Analysis of OATP2 (OATP-C/SLC21A6) and OATP8 (SLC21A8): Their contributions to hepatic uptake clearance

Gordon Conference (Drug Metabolism) New Hampshire, USA 2003.7

Yuichi Sugiyama "Integrated use of single and double-transfected MDCK cells; Utility in predicting transporter-mediated drug clearance and drug interactions in vivo"

Gordon Conference (Drug Metabolism) (招待講演) New Hampshire, USA 2003.7

岩井めぐみ、鈴木洋史、西里洋平、家入一郎、大坪健司、杉山雄一 ヒト Organic Anion Transporting Polypeptide 2 (OATP2/SLC21A6) 遺伝的多型変異体の比較解析: ヒト *in vivo* データとの定量的相関

第10回肝細胞研究会, 東京 2003.7

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 輸送特性の速度論解析

第10回肝細胞研究会, 東京 2003.7

Kazuya Maeda, Miyuki Kambara, Masaru Hirano and Yuichi Sugiyama

EVALUATION OF THE CONTRIBUTION OF ORGANIC ANION TRANSPORTING POLYPEPTIDES (OATP) TO OVERALL HEPATIC UPTAKE IN HUMAN LIVER

12th North American ISSX Meeting, Rhode Island, USA 2003.10

平野雅、前田和哉、設楽悦久、杉山雄一 ビタバスチンの肝取り込み過程における OATP ファミリーの関与および寄与率の評価

第18回日本薬物動態学会年会 札幌 2003.10

岩井めぐみ、広内幹和、鈴木洋史、西里洋平、井戸田昌也、小澤正吾、澤田純一、家入一郎、大坪健司、杉山雄一 ヒト肝臓における取り込み・排泄に関与するトランスポーターの遺伝的多型による機能変化と臨床における意義

第18回日本薬物動態学会年会(シンポジウム) 札幌 2003.10

Yuichi Sugiyama "Drug Transporters and their role in drug disposition"

2003 AAPS Annual Meeting and Exposition (招待講演), Salt Lake City, Utah, USA, 2003.10

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 cerivastatin の肝臓の膜透過過程における輸送機構の解明

第17回日本実験動物代替法学会 神奈川 2003.11

前田和哉、平野雅、神原美由紀、杉山雄一

ヒト肝臓の血中からの取り込みに関わる各トランスポーターの寄与率の評価法の検討

日本薬学会関東支部第28回学術講演会 東京 2003.12

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

ヒト肝臓における膜透過過程を模倣したトランスポーター共発現系を用いた statin 類の経細胞輸送機構の解析

日本薬学会関東支部第28回学術講演会 東京 2003.12

Yuichi Sugiyama "Prediction of transporter-based drug interactions: In vitro-in vivo correlations"

Drug Discovery and Development Summit-2003; Novel Concepts and Technologies to Accelerate Drug Development (招待講演), Hawaii, USA, 2003.12

Kazuya Maeda, Masaru Hirano, Miyuki Kambara, and Yuichi Sugiyama

STRATEGIES FOR EVALUATING THE CONTRIBUTION OF ORGANIC ANION TRANSPORTING POLYPEPTIDE (OATP) FAMILY TRANSPORTERS TO HUMAN HEPATIC UPTAKE

MMT3D Tokyo 2004.2

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

研究要旨 本年度は、OATP-C 遺伝子多型の臨床的意義を中心に以下の検討を加えた；(1) 肝でのビリルビン輸送への関与、(2) プラバスタチン服用後のコレステロール低下作用の個人差への関与。(3) 新規トランスポーターとして BCRP を取りあげ、組織発現量と多型との関連、生体中での基質薬物の輸送能への関与を健常成人を対象として検討した。(1) 抱合型および遊離型ビリルビンを指標とし検討を加えた結果、MRP2 遺伝子変異(Val417Ile, Ser789Phe)の関与は見られなかったが、OATP-C 遺伝子変異、特に*15 変異保有者で血中遊離型ビリルビンの有意な高値が観察された。さらに、プラバスタチンの肝クリアランスとの間に、有意な負の相関が認められた。これらの結果から、*15 変異による遊離型ビリルビンの肝取り込みの低下が示唆される。(2) 同様に、*15 変異を有する患者ではプラバスタチン服用後、血中コレステロール値は低下するが、その程度は、変異が無い群より弱い。いずれの検討も、肝を介した生体物質、薬物輸送の個人差に OATP-C 遺伝子多型が深く関与することを示唆する。(3) BCRP 遺伝子においても、胎盤や肝臓での発現に影響する変異が数種類存在すること、さらに、一部の変異は腸管での薬物輸送に関与することが示唆された。

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) OATP-C : 1-a. 健常成人 23 名を対象に、OATP-C, MRP2, UGT1A1 遺伝子多型の肝でのビリルビン輸送への影響を検討した。抱合型および遊離型ビリルビン値を指標とした。1-b. プラバスタチンを服用する患者 (n=31) を対象に、服薬開始後 15 ヶ月時の血中コレステロール低下の度合いと多型との関連を評価した。

(2) BCRP : BCRP 遺伝子型が既知の健常成人ボランティア 50 名を対象とし、基質薬物、4-メチルウンベリフェロン(4MU)を投与し、体内動態との関連を評価した。4MU および硫酸抱合体濃度(4MUS)を測定し、体内動態パラメータを算出した。

(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が承認

を受けた。総ての研究は鳥取大学医学部倫理審査委員会においても、審査・承認を受けた後実施した。

C. 研究結果

本研究を通して、以下の主な知見が得られた。

(1-a). MRP2 遺伝子では、Val417Ile, Ser789Phe、2 種類の変異が見られた。しかし、これらの変異の抱合型ビリルビン値への影響は見られなかった。一方、OATP-C 遺伝子変異で、機能低下が報告される*15 変異を有する被検者では、有意な遊離型ビリルビン値の上昇が観察された。さらに、基質薬物であるプラバスタチンの肝クリアランスと遊離型ビリルビン値には有意な負の相関が見られた。UGT1A1 遺伝子変異については、Gilbert 症候群の原因遺伝子変異である、*28 変異のホモ型被検者で、ビリルビン値の著しい高い値が見られた。しかし、本患者は同時に*15 変異も有していた。(1-b). プラバスタチン服用 15 ヶ月後の血中コレステロール値は、1 名を除き総ての患者で低下が見られたが、服用前の値からの低下率は、+0.99~ -32.2%と患者間で大きな個人差が認められた。この原因を明らかにする目的で、OATP-C*15 に注目した。その結果、野生型(*1a/*1a)患者の平均低下率が約 30%であったのに対し、*15 変異保有者での値は約 13%であった。(2). BCRP 遺伝子の多型解析を行った結果、20 箇所の変異を同定した。その中で、421C>A (141Gln>Lys)

がヒト胎盤での発現量を低下する傾向が見られた。臨床試験の結果、376C>Tあるいは421C>A変異を有することで、高い4MUS濃度となった。また、肝や胎盤での発現レベルを検討中、対立遺伝子間で発現量の異なる検体が見られた。

D. 考察

昨年度の検討より、OATP-C遺伝子多型、特に*15変異による肝への基質取り込み能の低下が示唆された。本年度はこの仮説を実証した。*15変異保有者で、遊離型ビリルビン値が高値であったこと、さらに、プラバスタチンによる血中コレステロール値への効果が不十分であったことは、いずれも、基質となる生体物質や医薬品の肝への取り込み能の低下を強く支持する結果と言える。さらに、以下の臨床的にも重要な知見を伴う；(a)遊離型ビリルビン高値は肝でのグルクロン酸抱合能の低下が原因と指摘され、UGT1A1*28変異が原因となるGilbert's syndromeがよく知られている。しかし、OATP-C*15変異も同様に高値の原因となり、その機序は代謝能とはまったく異なること。遊離型ビリルビン高値が従来より指摘される機序以外の機序でも生じる可能性があること。(b)HMG-CoA還元酵素阻害剤の臨床使用において、*15変異保有患者ではプラバスタチン以外の選択が望ましい。BCRPに関する研究では、腸管での薬物吸収に寄与する多型の存在が確認されたが、と同時に、遺伝子発現に関する特殊な制御が観察された。一部のヒト組織検体では、片側アレルのみの発現が見られた。BCRP遺伝子がimprinting geneであることが示唆される。仮にimprinting geneであれば、多型のみでは表現型を十分に説明できないことになり、本領域の研究に新しい概念の導入が必要となる。現在、発現量や臨床試験での結果との関連を評価している。

E. 結論

OATP-Cは基質となる生体物質や医薬品の肝取り込みに重要な役割を果たしている。ビリルビンに関する疾患やHMG-CoA還元酵素阻害剤に見る効果の個人差に関与すると考えられる。

F. 健康危険情報

特にないが、疾患や医薬品効果の個人差解明に関する知見が得られた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takane H, Ieiri I and Otsubo K. Genetic polymorphism of organic anion and cation transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy. *Curr Pharmacogenomics*, 1, 245-57, 2004

Ieiri I, Takane H and Otsubo K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet*, in press, 2004

2. 学会発表

小林大介、家入一郎、高根 浩、木村美由紀、紀川純三、陶山比奈子、入江 伸、浦江明憲、鈴木洋史、楠原洋之、寺川直樹、美根和典、大坪健司、杉山雄一 BCRP 遺伝子多型解析と機能評価。

第18回日本薬物動態学会、札幌、2003.10

家入一郎、廣田 豪、鈴木洋史、木村美由紀、川端 清、樋口 駿、大坪健司、杉山雄一 肝におけるビリルビン輸送活性とMRP2、OATP-C遺伝子多型。

第42回中四国薬学会、高松、2003.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究要旨 ヒト胎盤細胞(hPDMC)から産生されるヒト血管新生因子(hVEGF)が生物学的活性を有するか、NOD/SCID マウスの下肢虚血モデルに移植して虚血が改善するか、移植された細胞がどの程度の期間 hVEGF を産生し続けるかを検討した。hPDMC の培養上清は hUVEC (human umbilical vein endothelial cell)の増殖を刺激し、hVEGF に生物活性があることが示された。また細胞移植はマウスの虚血を改善し、real-time RT-PCR で検索した hVEGF mRNA レベルから少なくとも移植後 7 日間は局所で hVEGF を産生していることが明らかとなった。

A.研究目的

胎盤は母体と胎児との栄養交換を行う臓器であり、胎児の成長とともに短期間で発達する。またその機能を果たすため非常に血管に富んだ臓器であることはよく知られている。このような事実から、我々は胎盤を構成する細胞は豊富に血管新生因子が産生するのではないかと考え、ヒト胎盤を酵素的に処理して培養し、その上清中あるいは細胞抽出物中のヒト血管内皮成長因子 (human vascular endothelial growth factor: hVEGF) を測定した。その結果、胎盤由来間葉系細胞 (human placenta-derived mesenchymal cells: hPDMC) が多量の hVEGF を産生することを見出した。しかしながら hPDMC から分泌された hVEGF の生物活性、hPDMC の細胞移植による in vivo での血管新生、hPDMC から分泌される hVEGF の薬物動態、などについては不明である。本研究の目的は、① hPDMC から産生される hVEGF の生物活性の検討、② 虚血動物モデルでの hPDMC の細胞移植による血流の改善、③ 細胞移植された hPDMC から hVEGF の分泌動態、の 3 つである。

B.研究方法

① hPDMC から産生される hVEGF の生物活性の検討

hPDMC が産生される hVEGF の生物学的活性について検討するために、Conn G らの方法 (*Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 87:1323-7, 1990) にのっとり hPDMC の培養上清が hUVEC (human umbilical vein endothelial cell) の増殖を刺激するかを検索する。hPDMC の培養上清の hVEGF 濃度が十分に高くない場合は、増殖刺激活性が低い可能性がある。そのような場合は、培養上清を Centriplus® を用いて濃縮し、hUVEC に作用させる。h

UVEC は 1×10^6 cells/mL の密度で 24 穴のカルチャーディッシュにまき、hPDMC の培養上清を hUVEC の培地に加え、ウエルごとのサイミジン (^3H -thymidine) の取り込みをシンチレーターでカウントする。実験は T replicate で実験を行う。ELISA で測定した hVEGF の値が生物学的活性と一致するかを検討する。

② NOD/Shi-scid における hPDMC の細胞移植に関する検討

異種間細胞移植 (Xenograft) が可能な、重度免疫不全マウスの NOD/Shi-scid マウスを日本クレアから購入する。片側の大腿動脈を結紮して下肢虚血モデルを作製する。hPDMC を筋肉内に注射し、移植前、移植 7 日後、移植 14 日後の血流をレーザードップラーを用いて観察する。対照群としては PBS のみ、およびヒト末梢血単核球を用い、hPDMC の細胞移植による虚血の改善度を測定する。

③ 細胞移植された hPDMC から hVEGF の分泌動態

NOD/Shi-scid マウスに hPDMC を移植し、1 時間後、2 日後、7 日後にマウスを屠殺して注射部位の筋肉を取り出す。Trizol 法で総 RNA を抽出する。Superscript III で reverse transcriptase を用いてヒト GAPDH mRNA の量と、ヒト VEGF mRNA の量をリアルタイム PCR 法で半定量する。ヒト GAPDH mRNA の量が移植した hPDMC の生存を反映し、ヒト VEGF mRNA が VEGF の分泌期間を反映するのでこれらを検討する。

C.研究結果

① hPDMC から産生される hVEGF の生物活性の検討

培地にリコンビナント hVEGF を添加する

と用量依存性に hUVEC の ^3H -サイミジン取り込みが増加した。ヒト胎盤細胞の培養上清を添加しても hUVEC の ^3H -サイミジン取り込みは増加した。 ^3H -サイミジンの取り込み値はリコンビナント hVEGF 添加とほぼ同等であり、ヒト胎盤細胞から産生される hVEGF は十分な生物活性を有すると結論された。

②NOD/Shi-scid における hPDMC の細胞移植に関する検討

片側の大腿動脈結紮後、患肢の血流を健側と比較したところ、hPDMC 投与群で前値 0.2108 ± 0.0077 (mean \pm SE) に対し、7 日後は 0.5110 ± 0.056 に改善した (n=17)。PBS のみを投与した群では前値 0.2277 ± 0.012 で、7 日後は 0.3461 ± 0.0275 であった (n=13)。ヒト末梢血単核球投与群では前値 0.2071 ± 0.0093 で 7 日後は 0.3996 ± 0.0446 であった (n=17)。hPDMC 投与群は対照群に比較して有意に血流を改善した (Mann-Whitney u-test, $p < 0.05$) が、ヒト末梢血単核球投与群は対照群に比較して有意差を認めなかった。このようにヒト胎盤細胞は *in vivo* において血管新生作用を示した。

③細胞移植された hPDMC から hVEGF の分泌動態

hPDMC 移植 1 時間後の筋肉内 hVEGF mRNA の発現の程度を 1.0 とした場合、2 日後は 0.11 ± 0.017 (n=3)、7 日後は 0.013 ± 0.00086 であった。非投与群では発現は認められなかった。この実験から移植された hPDMC は少なくとも 7 日間は投与部位で生存して hVEGF を産生していることが示唆された。

D. 考察

生活様式の欧米化に伴い、日本では糖尿病をはじめとする生活習慣病に伴う心筋梗塞や下肢閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患の頻度が増加している。これらの疾患は生命を脅かしたり、生活の質を著しく低下させるため、医療上重要な問題であり、また治療の社会的ニーズも高い。虚血性疾患に対する血管新生促進療法としては、国内外のいくつかのグループが、数種類の異なった試みを行っている。それらは以下の通りに大別される。

- ④ 血管新生促進因子を虚血部分に局所注入する方法。
- ⑤ 血管新生促進因子遺伝子を組み込んだプラスミドあるいはアデノウイルスベクターを患部に局所投与する方法。

⑥ 自己骨髄単核球、あるいは自己末梢血単核球を虚血部に注射する細胞療法。

①では局所投与された血管新生因子は速やかに吸収されて体循環に拡散してしまうため、因子を局所に止めて血管新生を促進することは困難である。②のプラスミドでは遺伝子発現効率の低さが問題となり、アデノウイルスでは発現効率は高いものの、アデノウイルスベクターをヒトに投与することの安全性が問題視されている。③の細胞療法では、自己の末梢血単核球や骨髄単核球を採取するために全身麻酔やアフェレーシスが必要となるなど患者への侵襲（負担）が問題となる。特に難治性の虚血性疾患は高齢者に多いのでこの問題は重要である。

以上の通り、患者への侵襲が少なく、安全かつ有効な新しい治療法の開発が望まれている。血管新生因子を産生する同種細胞の移植治療が可能になればこの問題は解決されるが、これまで安全で適切な細胞がなかった。私たちの見いだした胎盤細胞の移植はこの目的にかなっていると考えられる。局所での mRNA の発現は少なくとも投与後 7 日間認められた。今後血中での動態を解析する予定である。

E. 結論

hPDMC は生物学的に活性のある hVEGF を産生し、虚血動物モデルへ細胞移植すると有意に血流を改善した。移植された細胞は少なくとも 7 日間は hVEGF を産生し続けた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Zhang X., Nakaoka T., Nishishita T., Watanabe N., Igura K., Shinomiya K., Takahashi T.A., Yamashita N. Efficient adeno-associated virus mediated gene expression in human placenta-derived mesenchymal cells. *Microbiology and Immunology*, 47, 109-116, 2003
- Sato K., Yamashita N., Baba M., Matsuyama T. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cell. *Blood*, 101, 3581-3589, 2003
- Sato K., Yamashita N., Yamashita N., Baba M., Matsuyama T. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relaps. *Immunity*, 18, 367-379, 2003
- Watanabe T., Akishita M., Nakaoka T., Kozaki K., Miyahara Y., He H., Ohike Y., Ogita T., Inoue S.,

Muramatsu M., Yamashita N., Ouchi Y. Estrogen receptor beta mediates the inhibitory effect of estradiol on vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovascular Research*, 59, 734-744, 2003

Nagayama H. Sato K. Morishita M. Uchimaru K. Oyaizu N. Inazawa T. Yamasaki T. Enomoto M. Nakaoka T. Nakamura T. Maekawa T. Yamamoto A. Shimada S. Saida T. Kawakami Y. Asano S. Tani K. Takahashi TA. Yamashita N. Results of phase I clinical study using autologous tumor-lysate pulsed monocyte-derived mature dendritic cell vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2. *Melanoma Research*, 13, 1-10, 2003

Watanabe T, Akishita M, He H, Miyahara Y, Nagano K, Nakaoka T, Yamashita N, Kozaki K, Ouchi Y. 17beta-Estradiol inhibits cardiac fibroblast growth through both subtypes of estrogen receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 311, 454-9, 2003

Morishita M. Uchimaru K. Sato K. Yamashita S. Kanematsu T. Yamashita N. Thyroglobulin-pulsed human monocyte-derived dendritic cells induce CD4⁺T cell activation. *International Journal of Molecular Medicine*, 13, 33-39, 2004

T Nishishita, K Ouchi, Z Xiaohong, T Inazawa, K Yoshiura, T Nakaoka, N Watanabe, K Igura, T A. Takahashi and N Yamashita. A potential pro-angiogenic cell therapy for ischemic disease with human placenta-derived mesenchymal cells., in press, 2004

H.知的財産権の出願・登録状況

なし