

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

課題番号		
20030960A KH71066	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	乾 賢一 …… 1
961A KH71067	インフォームドコンセントに基づいた外科手術切除ヒト組織の医学研究利用ネットワーク体制の確立とヒト肝細胞を用いた試験系のバリデーション	大野泰雄 …… 11
962A KH71068	高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物有効性、安全性評価法の確立とその応用	永森静志 …… 21
963A KH71069	ヒト組織・細胞の新鮮材料を用いた薬物の作用評価の研究ーヒト組織バンクの効率的運用へ向けてー	松浦成昭 …… 25
964A KH72076	公共的な研究利用ヒト組織バンクシステム構築の検討	小林英司 …… 30
965A KH72077	眼組織からの幹細胞等の同定・単離・細胞株化およびこれらの保存方法に関する研究	篠崎尚史 …… 36
966A KH72078	ヒト組織の創薬研究資源化に関する研究	林 真 …… 42

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

臓器移植後のカルシニューリン阻害薬を中心とした免疫抑制療法の個別化と拒絶反応防御に関わる分子生物学的指標の探索を目指し、小腸や肝組織等の術検体及び末梢血検体を用いた遺伝子発現解析並びに遺伝子多型解析を実施し、得られた遺伝子情報を利用した投薬設計の構築を行うと共に拒絶反応防御予測のための候補分子群の特定を行った。

分担研究者

- (1) 京都大学医学部附属病院薬剤部
乾 賢一、矢野育子、増田智先
- (2) 京都大学医学部附属病院移植外科
田中紘一、尾池文隆、小倉靖弘
- (3) 国立成育医療センター薬剤治療研究部
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

A. 研究目的

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950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-糖タンパク質の mRNA 発現量が、術後初期のタクロリムス血中濃度/経口投与量比と良好な負の相関を示すことを明らかにしてきた。しかし、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な点が多い。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、拒絶反応を予防できるだけでなく、予期せぬ副作用の発現も未然に防止できると考えられる。

そこで本研究では、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、以下の研究計画を実施した。1) 生体肝移植手術時の胆管再建の際に切除される小腸組織片、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 遺伝子多型について、既に知られている部位を中心に多型解析を行い、種々表現型との比較解析を行った。3) 患者の全血由来の総 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、患者の容態との比較を行った。また、マイクロアレイで得られた結果の検証も行った。

B. 研究方法

(1) 対象被検者とインフォームド・コンセント

解析対象としては、京都大学において生体肝移植術の実施に同意した患者とした。また、被

検者が 15 歳未満の小児の場合においては、本人の意思に加え両親等適切な代諾者による同意を得ることとした。また、本研究内容についての説明は、移植治療そのものの説明に引き続いて約 1 時間かけて行われること、説明直後の署名捺印を求めず移植術当日朝に研究への協力意思の有無を説明医師に書面にて伝えること、署名捺印された同意書は京都大学医学部附属病院移植コーディネーター室に施設の上厳重に保管されること、個人情報識別管理者は連結可能匿名化の上で本研究担当者に検体を受け渡すこと等を遵守した。なお、本研究実施期間中小腸検体 86 例、肝生検 160 例及び血液検体 160 例の採取と使用に同意を得ることができた。

(2) 倫理面への配慮

本研究は、ヘルシンキ宣言（1975 年、東京総会で修正）を尊重し計画されたものであり、対象患者個人のプライバシーをはじめとする人権擁護の優先を念頭に実施した。

すなわち、

- ・自由意思による同意が得られた場合にのみ実施対象とすること、
 - ・同意した場合でも随時撤回でき、それによる不利益を受けることはないこと、
 - ・血液や組織由来の核酸が他の目的に使用されないこと、
 - ・実施対象者の個人識別情報は連結可能匿名化方式（本研究では、免疫抑制剤の体内動態関連遺伝子及び薬効発現関連遺伝子の解析結果と薬物動態・免疫抑制効果発現の解析結果との比較解析を中心的な検討項目としているため、本方式での管理・保護が適当と考えられる）で厳重に管理・保護されること、
 - ・遺伝子解析結果を含むすべての検査結果については守秘義務を守ること、
 - ・研究成果の発表に際しては、個人が特定できない方法でのみ行うこと、
- を遵守することとした。

肝臓移植患者由来の肝組織の採取並びに小腸移植患者由来の小腸組織の採取については、従来

の病理検査の一環として行われるため、本研究のために改めて、または過量の採取をするものではなく、患者の不利益及び危険性は伴わない。

また、肝臓移植患者由来の小腸組織の採取については、従来肝移植術における胆管再建時に切除される組織の一部を使用するため、本研究のために改めて、または過量の採取をするものではなく、患者の不利益及び危険性は伴わない。

さらに、血液検体の採取については、臓器移植後頻繁に行われる免疫抑制剤の血中濃度測定時に採取されたものの余剰分を用いることとしているため本研究のために改めて、または過量の採取をするものではなく、患者の不利益及び危険性は伴わない。当該研究で用いられるヒト核酸試料については、連結不能匿名化による国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部への供与と遺伝子発現解析を実施した。また、遺伝子多型解析についてはインフォームド・コンセント取得機関である京都大学医学部附属病院で行った。遺伝カウンセリングは原則として行わないが、対象患者個人の「知る権利」及び「知らないでいる権利」を保護するため、患者自身の要望に応じ実施することとし、京都大学医学部附属病院遺伝子診療部の協力を得ることとした。なお、本研究計画の実施にあたり、血液及びヒト組織の一部を用いた免疫抑制剤の体内動態関連遺伝子並びに薬効発現関連遺伝子の発現変動と遺伝多型解析は、平成 13 年 6 月 12 日に「免疫抑制剤の体内動態と薬効発現に関わる遺伝子群の探索に関する臨床研究」という題目で京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会より承認書が交付されており、上記趣旨を逸脱することなくヒト組織の採取と使用を実施した。

(3) ヒト小腸組織の採取と粗膜画分および total RNA 画分の抽出

生体肝移植手術における胆管再建の際に切除される小腸組織を試料として用いた。切除後、直ちに液体窒素中で凍結した。凍結組織は 37℃ で急速に溶解し、粘膜部分を剥離した後に粗膜画分と total RNA 画分を同時抽出した。得られ

る粘膜部分が微量である場合や小腸移植患者由来の生検組織を使用する場合には、total RNA画分の抽出を優先した。

(4) ヒト小腸組織に発現する P-糖タンパク質および CYP3A4 の定量

P-糖蛋白質をコードする MDR1 mRNA および CYP3A4 mRNA を同時定量した。遺伝子配列上極めて類似している CYP3A アイソフォーム (CYP3A4、5、7 及び 43) を分離評価可能なリアルタイム PCR 法を中心とした測定系の構築にも成功した。

(5) ヒト全血由来の総 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について、それぞれに特異的な反応条件と標準遺伝子を人工的に作成し、リアルタイム PCR 法での定量数値化を行った。測定の対象としては、タクロリムスの体内動態に関わる遺伝子群、タクロリムスの薬理効果または拒絶反応に関わる遺伝子群として FK506 binding protein (FKBP) ファミリーに属する 10 遺伝子、サイトカイン類とその受容体群 30 遺伝子の合計 70 遺伝子を選択した。

(6) LC/MS/MS 法による臨床検体の測定

京大病院にて前処理を行った臨床サンプルを、測定時に 100 μ L の移動相に溶解し、その 20 μ L を LC/MS/MS に注入した。MS/MS 条件は、検出器には API3000System (Applied Biosystem 社) を用い、イオン化法は ESI 法 (positive イオンモード) を用い、selected イオンとして FK506 (m/z 821 \rightarrow 768) ,M-1 (m/z 807 \rightarrow 772) ,M-2 (m/z 807 \rightarrow 754)、M-3 (m/z 807 \rightarrow 754) および IS (931 \rightarrow 864) を設定した。定量限界はそれぞれ試料中濃度として 0.5ng/mL であった。

(7) GeneChip を用いた遺伝子発現の解析

本研究に使用した GeneChip は、EST を含む約 12,000 個のヒト遺伝子が配置された Human

Genome U95A (Affymetrix) であり、作業は Affymetrix 社の提供する手順に従った。まず、対照群 (コントロール、2 例)、拒絶反応群 (2 例) のトータル RNA の一部を用いて Agilent 2001 Bioanalyzer (Agilent) により電気泳動を行い、RNA 品質を確認のうえ GeneChip 解析の試料に使用した。cRNA プローブは RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製し、260nm の吸光度を測定した。測定結果から、20 μ g の cRNA プローブをアルカリ加水分解溶液 (200mM Tris-Acetate pH8.1, 50mM KOAc, 150mM MgOAc) 中に 94 $^{\circ}$ C、35 分間処理して断片化した。次に、Eukaryotic Hybridization Control Kit (Amasham Pharmasia) を用いて Hybridization cocktail mix を調整し、45 $^{\circ}$ C、600rpm の回転数で 16 時間ハイブリダイズした。反応後、Fluidics station (Affymetrix) を使ってチップを洗浄し、ハイブリダイズしなかったプローブを除去した。そして、Phycoerythrin ラベルされたストレプトアビジン (Phycoerythrin streptavidin; Moreculer Probes) で染色を行い、HP Gene Array Scanner (HEWLETT PACKARD) にて、レーザーで蛍光強度を読みとった。

スキャンを行った画像は、統計処理ソフト R を利用した、AffyR (Bioconductor project) により数値化し、データの補正を行った。得られた数値をもとに、拒絶反応群で変化した遺伝子の変動倍率を計算した。

C. 研究成果

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：術時小腸組織を用いて得られる MDR1 発現レベルに基づいたタクロリムス初期投与量予測を実施した。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) を非介入症例として、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。その結果、介入例におけるタクロリムスの血中濃度推移は、非介入例と比較して早期に 10ng/mL に到達することが、統計的有意差をもって明らかとなった。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 104 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。一方、生体部分肝移植の特徴である、移植肝重量の個人差にも影響を受けることが示唆された。従って、術時の小腸 MDR1 発現レベルに加え、術前の画像検査で得られる予想移植肝重量も考え合わせることで、より精度の高い初期投与量設定に役立つことが期待される。

遺伝子多型解析：移植肝よりゲノム DNA を抽出し、MDR1 遺伝子において既に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。特に 3435C/T 多型については、生体肝移植患者の小腸 P-糖タンパク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、すなわち、MDR1 遺伝子の 3435 番目の塩基が C の多型を有している個体は、T の多型を有している個体よりも小腸 CYP3A4 発現が高いことを明らかにした。また、CYP3A5 mRNA 成熟過程におけるスプライシング異常を引き起こす*3 多型についても移植肝を中心に実施したところ、野生型 (*1/*1) の肝臓を移植された症例では総じて術後のタクロリムス投与量の漸増を要することが認められた。従って、術前検査における CYP3A5 多型検査が、免疫抑制剤の術後投与計画に反映できることが示唆された。

肝 CYP3A サブファミリーの発現量：肝におけるタクロリムスの主要代謝酵素である CYP3A4

並びにそのアイソフォーム発現量の定量数値化を行った。術時肝 CYP3A サブファミリーの発現レベルを調べた結果、CYP3A4 が最も多いこと、CYP3A5 mRNA レベルは*3 多型に強く影響を受けることが明らかとなった。さらに、移植肝体重比に肝 CYP3A4 mRNA 発現量を乗じることで得られる「移植代謝酵素量」を仮定したところ、本パラメータの高値を示す患者群では、経日的なタクロリムス投与量の漸増が有意に必要であることが示された。従って、術時の小腸に加え移植肝を用いた遺伝子発現解析を行うことで、少なくとも術後約 1 ヶ月の入院期間中における投薬量の推移予測の可能性が示唆された。

末梢血検体を用いた解析：小腸や肝臓に発現する MDR1 は、白血球にも存在することから、タクロリムスの薬効発現細胞であるリンパ球への蓄積性にも影響を及ぼすことを仮定し、術後 3 日目並びに 7 日目の末梢血検体より抽出した total RNA を用いて発現解析を行った。その結果、末梢血白血球 MDR1 mRNA レベルが高い患者群では、8ng/mL という比較的高値にタクロリムスのトラフレベルをコントロールされているにも拘わらず、約 30%に拒絶反応が発症することが示された。一方、MDR1 mRNA の低発現群では、8ng/mL 以上にトラフ値を保つことによって、拒絶反応の発症率が 0%であった。

網羅的遺伝子発現解析：小児患者を対象として、マイクロアレイ解析により得られた拒絶反応関連遺伝子群 207 種類の中から、移植免疫に関連する 23 種類の遺伝子を選択し、全検体を用いてリアルタイム PCR による発現レベルの定量化を行った。その結果、11 種類の遺伝子について拒絶反応と密接に関連することが示された。これらを、テキストマイニングソフトを用いて文献検索し、それぞれの因子について調べた結果、どれも細胞の増殖に関連することが判明し、これまで知られていた IL-2 による経路以外の白血球増殖シグナルが術後の急性拒絶反応に関与することが見出された。

さらに、HCV 陽性の成人患者を対象とした解析により、非常に多くの遺伝子発現の変動がモニターできた。この中にも免疫拒絶に関わる情報伝達分子など多くの遺伝子が含まれていた。さらに、患者の病歴との照合より、免疫抑制剤の感受性予測に役立つと考えられるリンフォカイン、リンフォカイン受容体などが示された。

LC/MS/MS 法による高感度測定：2,000 を超える検体を用いて、全血中未変化体タクロリムス並びに代謝物 M1 ~M3 の LC/MS/MS による経日的な定量を行った。胆汁検体を得ることができた症例について、タクロリムスの血中濃度と胆汁中未変化体濃度並びに代謝物 M1 濃度との比較を行ったところ、正の相関関係は得られなかった。さらに、術後経過における移植肝の機能回復が遅延している患者の末梢血サンプル中並びに胆汁サンプル中には、ほとんど代謝物が検出されないことが判明した。

また、慢性拒絶反応が疑われた後にタクロリムスのトラフレベルが十分に得られにくい症状を来した患者では、胆汁中 M2 濃度が高く末梢血中未変化体タクロリムス濃度の約 100 倍程度にまで濃縮されていることが判明した。これらの患者では胆汁を体外に排除するドレンチューブが装着されていたことから、得られたデータについて、病棟担当薬剤師を通じ主治医と相談した結果、一時的にチューブの抜去を行ったところ、タクロリムスのトラフレベルが次第に上昇することが認められた。

D. 考察

術時検体を用いた遺伝子解析：肝臓移植時に切除される小腸組織及び術時肝生検の一部を用いた遺伝子発現解析の結果から、小腸 MDR1 mRNA レベルはタクロリムスの初期投与量を設定する際の有用な分子生物学的パラメータになり得ることが示された。また、移植肝重量/体重比に肝 CYP3A4 mRNA レベルを乗じて得られる仮想移植代謝酵素量を見積もること、術後経過日数に従った dose escalation

を予想することができ、少なくとも約 1 ヶ月間の術直後入院期間のフォローに貢献しうる成果を得ることができた。さらに、移植肝 CYP3A5 SNP 解析によってより代謝能の高い肝臓を移植された患者を見分けることも可能となった。以上、肝臓移植時の小腸及び肝組織を用いた遺伝子解析は、約 1 ヶ月間の術後入院期間中におけるタクロリムスの血中濃度推移の予想に貢献するだけでなく初期用量決定など具体的な数値化にも還元可能であることが示唆された。今後、肝機能などの臨床情報や他の遺伝子情報も組み入れることでより詳細な個別化免疫抑制療法へと繋げることが可能になると考えられる。

末梢血検体を用いた解析：これまで、タクロリムスの血中濃度域は 10~20ng/mL とされてきたが、臨床現場において副作用（特に腎機能障害）を回避するために、目標血中濃度が次第に低値となってきたことは否めない。従って、副作用の発現する割合は低下したものの、拒絶反応を来す症例が約 30~40%存在することが問題となっていた。循環血中には、未変化体タクロリムスや主要代謝物 M1~M3 が存在すること、肝機能異常などに伴う代謝活性の低下により胆汁中代謝物濃度が著明に低下することが高感度 LC/MS/MS 法による 2,000 にも及ぶ臨床データから明らかとなった。従って、白血球に発現する MDR1 は、白血球中のタクロリムスの排出を媒介することによって、リンパ球中へのタクロリムス分布量の調節因子として働くことが想定された。約 130 検体における mRNA 発現解析の結果、末梢血白血球 MDR1 の高発現群では約 30%に拒絶反応が発症することが判明した。これらの結果、患者個々の白血球中 MDR1 mRNA レベルを事前に評価することによって、個別の目標血中濃度を設定することができ、個別化有効治療域の設定法確立に繋がることを強く示唆された。

さらに、小児胆道閉鎖症を原疾患とする患

者を対象に得られた網羅的遺伝子発現解析の結果、多くの遺伝子が拒絶反応発症 2 日前に変動していることが示された。個々について数値定量化を行った結果、10 種類程度の遺伝子について細胞増殖に関連することが示され、T 細胞受容体→カルシニューリン→NFAT 脱リン酸化→IL-2 発現亢進→リンパ球増殖→拒絶反応といった一連の Pathway とは異なる経路が拒絶反応発症に関わることが浮き彫りとなった。また、HCV 陽性患者を対象とした場合でも同様の結果を得ていることから、本研究によって見出された遺伝子群の客観的な評価を行い、拒絶反応予測に応用可能な因子群の特定が期待される。今後、さらに詳細な解析を進めドナー抗原特異的な拒絶反応発症に関わる因子群を同定することにより、拒絶反応抑制法が確立できると考えられる。

E. 結論

生体肝移植術前の画像診断情報である移植肝重量予測データ、移植術時に得られる小腸組織及び移植肝組織、術後の末梢血白血球由来 RNA サンプル並びに術後の末梢血検体や胆汁サンプルを用いて総合的な遺伝子発現解析、遺伝子多型解析及び薬物の高感度測定を実施することによって、免疫抑制剤タクロリムスの個別化投与設計に向けた有用な情報を収集・体系化することができた。すなわち、移植肝重量予測値、小腸MDR1 mRNA レベル、移植肝 CYP3A4 発現レベル、移植肝 CYP3A5 SNP 診断データは、術直後から約 1 ヶ月にわたるタクロリムス血中濃度推移・投与量調節のための有用な分子生物学的指標になり得ること、術後の代謝物プロファイルの検索は移植肝の機能回復過程を確認することができること、末梢血白血球 RNA 分析は拒絶反応直前のイベントをモニターしうることなどであり、研究事業開始時に設定した目標を概ね達成できたと考える。本研究成果は、臓器移植医療における個別化免疫抑制療法としての臨床応

用と共に、新たに見出された種々の問題点解決に向けた研究展開へと繋がることが期待される。

F. 成果発表

1. 論文発表

- 1) Masuda S, Uemoto S, Goto M, Fujimoto Y, Tanaka K, and Inui K.: Tacrolimus therapy according to mucosal MDR1 levels in recipients of small bowel transplantation. *Clin Pharmacol Ther*, 75 (4), 352-361 (2004).
- 2) Uwai, Y, Masuda, S, Goto, M, Motohashi, H, Saito, H, Okuda, M, Nakamura, E, Ito, N, Ogawa, O, and Inui, K.: Common single nucleotide polymorphisms of MDR1 gene have no influence on its mRNA expression level of normal kidney cortex and renal cell carcinoma in Japanese nephrectomized patients. *J Hum Genet* 49 (1), 40-45 (2004).
- 3) Ishikawa, T., Tsuji, A., Inui, K., Sai, Y., Anzai, N., Wada, M., Endou, H., and Sumino, Y.: The genetic polymorphism of drug transporters: functional analysis approaches. *Pharmacogenomics* 5 (1), 1-33 (2004) [Review].
- 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*, 42 (13), 1161-1178 (2003).
- 5) 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. *Liver Transpl*, 9 (10), 1108-1113 (2003).
- 6) Goto, M., Masuda, S., Saito, H. and Inui,

- K.: Decreased expression of P-glycoprotein during differentiation in human intestinal cell line Caco-2. *Biochem Pharmacol*, 66 (1), 163-170 (2003).
- 7) Igarashi, T., Yano, I., Saito, H., and Inui, K.: Decreased cyclosporin A concentrations in the absorption phase using microemulsion preconcentrate formulation in rats with cisplatin-induced acute renal failure. *Biol Pharm Bull*, 26 (11): 1591-1595 (2003).
- 8) Katsura, T. and Inui, K.: Intestinal absorption of drugs mediated by drug transporters: mechanisms and regulation. *Drug Metab Pharmacokin*, 18 (1), 1-15 (2003) [Review].
- 9) 増田智先, 乾 賢一.: 臓器移植患者における個腹化免疫抑制療法. *臨床薬理*, 34 (5): 279-282 (2003) [総説].
- 10) Niwa T, Shiraga T, Hashimoto T, and Kagayama A : Effect of Cefixime and Cefdinir, Oral Cephalosporins, on Cytochrome P450 Activities in Human Hepatic Microsomes, *Biol. Pharm. Bull.*, 27(1), 97-99(2004)
- 11) Niwa T, Shiraga T, Hashimoto T, and Kagayama A: Effect of Nilvadipine, a Dihydropyridine Calcium Antagonist, on Cytochrome P450 Activities in Human Hepatic Microsomes, *Biol. Pharm. Bull.*, 27(3), 415-417(2004)
- 12) Naritomi Y, Terashita S, Kagayama A, and Sugiyama Y: Utility of Hepatocytes in Predicting Drug Metabolism: Comparison of Hepatic Intrinsic Clearance in Rats and Humans In Vivo and In Vitro, *Drug Metab. Dispos.*, 31(5), 580-588(2003)
- 13) Tozuka Z, Kaneko H, Shiraga T, Beppu M, Niwa T, and Kagayama A: New SRM Data Dependent Exclusion (MS)ⁿ Measurement for structural determination of drug metabolites using LC/ESI/Ion Trap MS, *Drug Metabol. Pharmacokin.*, 18(6), 390-403(2003)
- 14) Narutomi Y, Teramura Y, Terashita S, and Kagayama A: Utility of Microtiter Plate Assays for Human Cytochrome P450 Inhibition Studies in Drug Discovery: Application of Simple Method for Detecting Quasi-irreversible and Irreversible Inhibitors, *Drug Metab. Pharmacokin.*, 19(1), 55-61(2004)
- 15) Tozuka Z, Kaneko H, Shiraga T, Mitani Y, Beppu M, Terashita S, Kawamura A, and Kagayama A: Strategy for structural elucidation of drugs and drug metabolites using (MS)ⁿ fragmentation in an electrospray ion trap, *J. Mass Spectrom.*, 38(8), 793-808(2003)
- 16) Niwa T, Shiraga T, Yamasaki S, Ishibashi K, Ohno Y, and Kagayama A: *In vitro* activation of 7-benzoyloxyresorufin O-debenzylation and nifedipine oxidation in human liver microsomes, *Xenobiotica*, 33(7), 717-729(2003)
- 17) Chalothorn D, Tobita K, McCune DF, Robertson D, Perez DM, Edelmann SE, Tanoue A, Tsujimoto G, Post GR, Lasley RD, Piascik MT. Differential cardiovascular regulatory activities of the alpha 1B and alpha 1D adrenoceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 305:1045-1053.
- 18) Koshimizu T, Tanoue A, Hirasawa A, Yamauchi J and Tsujimoto G. Recent Advance of α_1 -Adrenoceptors *Pharmacology & Therapeutics* 2003; 98:235-244.
- 19) Harasawa I, Honda K, Tanoue A, Shinoura H, Okamura H, Murano N, Tsujimoto G, Higa K, Takano Y, Kamiya K. Responses to noxious stimuli in the mice

lacking alpha 1D adrenergic receptors. *Neuroreport*. 2003; 14: 1857-1860.

20) Tanoue A, Koshimizu T, Shibata K, Nasa Y, Takeo S and Tsujimoto G. Insights into α_1 adrenergic receptor function in health and disease from transgenic animal studies. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2003; 14: 107-113.

21) Tanoue A, Ito S, Oshikawa S, Kitagawa Y, Koshimizu T, Mori T & Tsujimoto G. The Vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J. Clin Invest*. 2004; 113: 302-309.

22) Chu CP, Kunitake T, Kato K, Watanabe S, Qiu de L, Tanoue A, Kannan H. Related Articles, Links Abstract The alpha(1D)-adrenergic receptor modulates cardiovascular and drinking responses to central salt loading in mice. *Neurosci Lett*. 2004; 356: 33-36.

23) Egashira N, Tanoue A, Higashihara F, Mishima K, Takano Y, Tsujimoto G, Iwasaki K, Fujiwara M. V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze. *Neurosci Lett*. 2004; 356: 195-198.

24) Oshikawa S, Tanoue A, Koshimizu T, Kitagawa Y, Tsujimoto G. Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: A combined pharmacological/knockout approach. *Mol Pharmacol*. 2004; 65: 623-629.

25) Mishima K, Tanoue A, Tsuda M, Hasebe N, Egashira N, Takano Y, Kamiya H, Tsujimoto G, Iwasaki K, Fujiwara M. Characteristic of behavioral abnormalities

in alpha 1D adrenoceptors deficient mice. *Behav. Brain. Res* In press. (2004)

2. 学会発表

- 1) 大前登典、後藤真樹、下村昌寛、増田智先、奥田真弘、乾 賢一：小腸虚血再灌流傷害からの回復過程における P-糖蛋白質の発現、日本薬剤学会第 18 年会 (2003 年 4 月、京都)
- 2) 乾 賢一：薬物トランスポータ研究の新しい展開：From Bench to Bedside、日本膜学会第 25 年会 (2003 年 5 月、東京) [特別講演]
- 3) 乾 賢一：臓器移植患者のテラーメイド免疫抑制療法、第 10 回 HAB 研究機構学術年会 (2003 年 5 月、東京) [特別講演]
- 4) 乾 賢一：臓器移植患者における小腸 P-糖タンパク質発現と免疫抑制療法、第 29 回アルカロイド研究会 (2003 年 6 月、大阪) [招聘講演]
- 5) 後藤真樹、増田智先、木内哲也、上本伸二、古俣孝明、齋藤秀之、田中紘一、乾 賢一：生体肝移植後の免疫抑制療法に困難を来した症例：小腸 P-糖蛋白質発現量に着目して、医療薬学フォーラム 2003 (第 11 回クリニカルファーマシーシンポジウム) (2003 年 7 月、広島)
- 6) 乾 賢一：高度医療を支える薬剤師の役割ー移植医療についてー、第 58 回東京薬科大学卒業後教育講座 (2003 年 7 月、東京) [招聘講演]
- 7) 乾 賢一：薬物トランスポータの遺伝子情報とテラーメイド薬物治療、酒蔵 VIL 1 周年記念式典・21 世紀 COE シンポジウム (2003 年 8 月、京都) [招聘講演]
- 8) Goto M, Masuda S, Omae T, Shimomura M, Okuda M, Inui K : The expressional variation of enterocyte MDR1: in vivo and in vitro analyses, 第 3 回国際会議「PharmaConference 2003」 (2003 年 8 月、スイス国、ポントレジーナ)
- 9) 増田智先、後藤真樹、橋田 亨、田中紘一、乾 賢一：個別化免疫抑制療法を目指した MDR1 遺伝子情報の臨床応用、第 18 回日本薬物動態学会年会 (2003 年 10 月、札幌) [招聘講演]

- 10) 奥田真弘、乾 賢一：タクロリムス血中濃度測定の精度管理と評価、第 39 回日本移植学会総会 (2003 年 10 月、大阪)
- 11) 増田智先、後藤真樹、奥田真弘、田中紘一、乾 賢一：ランスポータの機能、発現に基づく医薬品の適正使用：小腸移植患者におけるタクロリムス投与設計、第 25 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2003 年 11 月、金沢) [招聘講演]
- 12) 後藤真樹、増田智先、奥田真弘、乾 賢一、小倉靖弘、高田泰次、田中紘一：生体肝移植患者における肝代謝酵素発現量とタクロリムス体内動態、第 24 回臨床薬理学会年会 (2003 年 12 月、横浜)
- 13) 増田智先、後藤真樹、深津祥央、奥田真弘、乾 賢一、小倉靖弘、高田泰次、田中紘一：生体肝移植後の初期投与量設定に対する小腸 MDR1 mRNA 発現レベル定量の有用性、第 24 回臨床薬理学会年会 (2003 年 12 月、横浜)
- 14) 福土将秀、矢野育子、深津祥央、増田智先、奥田真弘、高田泰次、田中紘一、乾 賢一：小児生体部分肝移植患者におけるタクロリムスの母集団薬物動態解析とその評価、第 24 回臨床薬理学会年会 (2003 年 12 月、横浜)
- 15) Inui K: Clinical implications of drug transporters: immunosuppressive therapy in liver transplantation, The International Symposium on Metabolism and Membrane Transport in Drug Discovery and Development (MMT3D) (2004 年 2 月、東京) [招聘講演]
- 16) 後藤真樹、増田智先、小倉靖弘、深津祥央、奥田真弘、田中紘一、乾 賢一：生体肝移植患者の拒絶反応発症に及ぼす末梢血 MDR1 の影響、日本薬学会第 124 年会 (2004 年 3 月、大阪)
- 17) 増田智先、乾 賢一：薬物動態制御因子群の遺伝子解析を中心としたテーラーメイド免疫抑制療法、日本薬学会第 124 年会 (2004 年 3 月、大阪) [招聘講演]
- 18) 岩崎正彦、吉村義信、朝日 知、斎藤仁俊、酒井秀一、森田繁道、竹中 理、猪田利夫、谷上 信、檉山英二、青山昭則、中林毅司、大森悟史、桑原 隆、泉 高司、中村公一、中山幸晴、竹内光明、中村英樹、亀谷俊一、寺内嘉章、橋爪孝典、永山績夫、久米俊行、阿知良 周、川合博幸、河城孝史、中村明生、中井康博、加賀山 彰、白神歳文、丹羽卓朗、吉村卓也、森田 順、大澤福市、谷 匡人、大澤伸雄、井田圭一、野口 清：日本人一般母集団に見出された薬物動態関連遺伝子の SNP による cytochrome P450 への影響、第 18 回日本薬物動態学会年会 (2003 年 10 月、札幌)
- 19) 辻本豪三、細田千尋、奈佐吉久、小池勝夫、田上昭人.: $\alpha 1$ アドレナリン受容体サブタイプの血管機能における役割： $\alpha 1$ アドレナリン受容体変異マウスを用いた解析
第 32 回日本新脈管作動物質学会、2003 年 2 月 大阪
- 20) 辻本豪三、平澤 明、塩島 聡、勝間 進、山田将輝、田上昭人: 新規創薬標的探索のための機能ゲノム科学アプローチ
第 76 回日本薬理学会年会、2003 年 3 月 福岡
- 21) 押川小百合、辻本豪三、田上昭人: マウスバソプレッシン受容体各サブタイプのクローニング及び解析
第 76 回日本薬理学会年会、2003 年 3 月 福岡
- 22) 田上昭人、興水崇鏡、辻本豪三 : RNA エディティングによる変異エンドセリン B 受容体遺伝子の解析
第 76 回日本薬理学会年会、2003 年 3 月 福岡
- 23) 興水崇鏡、Mu-Lan He、上野晋、田上昭人、柳原延章、Stanko S. Stojkovic、辻本豪三: Novel splicing variant of mouse P2X2 receptors revealed Cterminal structure-dependent expression and desensitization of P2X2 receptors.
第 76 回日本薬理学会年会、2003 年 3 月 福岡
- 24) 細田千尋、田上昭人、押川小百合、興水崇鏡、奈佐吉久、竹尾聡、辻本豪三 : 高張食塩水負荷高血圧発症モデルにおけるアルファ 1D およ

びアルファ 1B-アドレナリン受容体機能の役割：アルファ 1-アドレナリン受容体変異マウスを用いた解析

第76回日本薬理学会年会、2003年3月 福岡
25) 興水崇鏡、田上昭人、押川小百合、北川葉子、辻本豪三: Vasopressin receptors in mouse islet beta-cells.

2003 World Congress On Neurohypophysial Hormones (国際下垂体後葉ホルモン会議)、8月31日~9月4日、2003、京都

26) 田上昭人(特別講演): 遺伝子改変動物を用いた α 1アドレナリン受容体およびバゾプレッシン受容体の解析

京都大学学内セミナー、2003年10月20日 京都

27) 興水崇鏡、田上昭人、奈佐吉久、北川葉子、竹尾聰、桑木共之、辻本豪三: 血圧調節におけるV1a バゾプレッシン受容体サブタイプの役割—V1a ノックアウトマウスの解析より—

第13回日本循環薬理学会、12月5日、2003、大阪

28) 細田千尋、田上昭人、押川小百合、北川葉子、興水崇鏡、奈佐吉久、竹尾聰、辻本豪三: 高張食塩水負荷高血圧モデルを用いたバゾプレッシン受容体V1a サブタイプの機能解析

第13回日本循環薬理学会、12月5日、2003、大阪

29) 田上昭人(特別講演): 遺伝子改変動物を用いた薬物受容体の機能解析及び創薬への応用

第102回熊本小児科学会、2月8日、2004、熊本

30) 田上昭人、伊藤修司、本多健治、押川小百合、北川葉子、興水崇鏡、森豊樹、辻本豪三: V1b バゾプレッシン受容体欠損マウスにおける視床下部-下垂体-副腎系への影響

第77回日本薬理学会年会、3月8日~10日、2004、大阪

31) 興水崇鏡、辻本豪三、田上昭人: カルベジロールのヒトアドレナリン受容体サブタイプに対する選択性について

第77回日本薬理学会年会、3月8日~10日、2004、大阪

32) 細田千尋、田上昭人、北川葉子、興水崇鏡、及川玲、苫米地敬、奈佐吉久、竹尾聰、辻本豪三: 高張食塩水負荷高血圧モデルを用いたバゾプレッシン受容体 V1a サブタイプの機能解析: バゾプレッシン受容体 V1a サブタイプ変異マウスを用いた解析

第77回日本薬理学会年会、3月8日~10日、2004、大阪

33) 北川葉子、押川小百合、田上昭人、興水崇鏡、辻本豪三: Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: A combined pharmacological/knockout approach.

第77回日本薬理学会年会、3月8日~10日、2004、大阪

34) Tanoue A, Koshimizu T, Nasa Y, Tsujimoto G.: Two α -ARs regulating vasopressor response have differential roles in postural hypotension.

The Mouse Molecular Genetics Meeting . September 3-7, EMBL- Heidelberg, (Germany), 2003

G. 知的所有権の取得状況

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

H. 知的所有権の取得状況

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

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社