

厚生労働科学研究研究費補助金
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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉山 雄一

平成17（2005）年3月

目 次

I. 総括研究報告	
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 vivo</i> 臨床データ解析 杉山雄一	11
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	17
3. ヒト胎盤細胞を用いた新治療開発のための基礎的検討 山下直秀	20
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 油谷直秀 (資料) 質量分析によるアレル間発現量多様性の検出	23
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	32

厚生科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

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

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 有機アニオンのヒト肝臓の排泄に関与するトランスポーターについて個々のトランスポーターの寄与の解析を行うために、OATP1B1(OATP2)と、MDR1, MRP2, BCRP のいずれかを両方発現する共発現系を構築し、ヒト canalicular membrane vesicle との相対的な発現量から寄与を見積もった。また、ヒト BCRP の遺伝子多型変異体7種の発現系を構築し、うち2つの変異で有意にウィルスあたりの発現量が低下することを示した。HMG-CoA還元酵素阻害薬(statin)の副作用である睡眠障害を理解するため、statinの脳内からの排出に関与するトランスポーターの寄与を明らかにすべく、Oat3, Oatp2発現細胞を用いた取り込みならびに、brain efflux index(BEI)法による脳からの statin の排出を測定した結果、同系統の薬物である pravastatin と pitavastatin では、脳内からの排出に関与するトランスポーターの寄与が異なることを明らかにした。臨床では、2型糖尿病治療薬であるメトホルミン(MT)の血糖降下作用に見るノンレスポンドーと OCT1 遺伝子多型との関連、MDR1 遺伝子のプロモーター領域に見る遺伝子多型とヒト胎盤における p-糖タンパク発現量との関連について検討を加え、MT のノンレスポンドーとレスポンドーとの違いを判別関数分析で評価した結果、OCT1 遺伝子変異の V408M の負の関与が認められた。また、V408M 変異の存在で mRNA 発現量の低下が認められた。また、プロモーター変異のハプロタイプに注目して解析した結果、2つの haplotype で mRNA およびタンパク発現量の顕著な増加が認められた。また、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、EBV 不死化リンパ球 RNA をマイクロアレイ解析することにより検討した。また、単塩基多型を利用して発現量多様性を質量分析測定装置による測定を開発すると共にトランスポーター遺伝子の2つのアレル間の発現量多様性があることを示した。

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）

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

昨年、ヒト肝臓の血管側に発現する有機アニオン類の取り込みに関与するトランスポーターの寄与を見積もる方法論を提唱したが、今年度は、ヒト肝臓の有機アニオン類の胆汁排泄に関与する排泄トランスポーターの寄与を見積もるべく、取り込みトランスポーター organic anion transporting polypeptide (OATP)1B1 (OATP2/OATP-C)と、肝臓における薬物排出トランスポーターとして主に知られている multidrug resistance (MDR)1, multidrug resistance-associated protein (MRP) 2, breast cancer resistance

protein (BCRP)の3種類をそれぞれ極性細胞に発現させた共発現系を構築し、さらにヒト肝臓ブロックから canalicular membrane vesicle (CMV)を調製し、各トランスポーターの発現系と CMV での相対的な発現量を比較し、共発現系での輸送活性を比較することで、ヒト肝臓における排泄トランスポーターの寄与を見積もることを試みた。

また、昨年の OATP1B1 の遺伝子多型の in vitro 解析に引き続き、本年度は、BCRP の遺伝子多型の in vitro 解析系を構築し、既知の遺伝子多型7箇所について、発現、機能、局在の変化について解析を行った。

また、高脂血症治療薬 HMG-CoA還元酵素阻害薬(statins)において、横紋筋融解症の他に、睡眠障害など中枢における副作用が報告されている。また、一方で statins には、最近神経保護作用の可能性の報告もあり、statins の脳移行メカニズムは、statins の適正使用を考える上で重要な因子の一つであると考える。そこで、我々は、脂溶性の異なる2種の statins, pravastatin と pitavastatin を用いて、脳内への取り込みならびに排泄を測定し、同時に阻害剤の感受性を指標とし

て、トランスポーターの寄与を見積もった。

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

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ため、本年度は、有機カチオントランスポーター(OCT1)および p-糖タンパク(MDR1)に着目し、遺伝子多型と薬物の動態・効果に関する解析を行った。

3) ヒト胎盤細胞を用いた新治療開発のための基礎的検討

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った。本年度は hPDMC の性質を調べ、臨床応用への可能性を検索する。

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

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。本研究においてはアレル特異的な遺伝子発現の多様性の有無とともに発現量の多様性を制御する DNA 多型について解析することを目的とする。本年は発現量多様性解析法の開発とトランスポーター遺伝子の発現量多様性の検討を行った。

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

1-1) ヒト肝臓の有機アニオンの胆汁排泄に関与するトランスポーターの寄与の解析

本解析には、モデル化合物として、estradiol-17 β -glucuronide (EG), estrone-3-sulfate (ES), pravastatin, cerivastatin の 4 種の ³H 標識体を用いた。共発現系の構築に関しては、OATP1B1/MRP2 発現系に関しては、当教室で既に構築されているものを解析に用いた。OATP1B1/MDR1 発現系については、MDCKII 細胞に MDR1 が安定発現している細胞に、OATP1B1 cDNA を含む発現ベクターを導入し、薬剤耐性マーカーを用いてクローン選択を行ったものを用いた。OATP1B1/BCRP 発現系については、OATP1B1 安定発現 MDCKII 細胞に、BCRP 発現組み換えアデノウィルスを感染させることで、一過性の共発現系として解析に用いた。ヒト CMVs は、ヒト肝ブロック (HAB(human and animal bridging) 研究機構より提供) より常法にて調製した。Western blot については、ヒト CMVs ならびに共発現系の crude membrane fraction を蛋白量を固定して数点ふって行うことで、総蛋白量と、トランスポーターの特異的なバンド濃度が線形性を保っているような量において、相対的な発現量の比較を行った。

1-2) ヒト BCRP 遺伝子多型変異体の *in vitro* 機能解析

これまでに知られているヒト BCRP の遺伝子多型 7 種 (V12M, Q141K, A149P, R163K, Q166E, P269S, S441N) について解析を試みた。遺伝子多型変異体は、組み換えアデノウィルスを作製するとき用いるヒト BCRP cDNA を持つシャトルベクターを、site directed mutagenesis の手法を用いて、常法によりターゲット箇所の遺伝子を置換し、それぞれの多型変異体の組み換えアデノウィルスを構築した。これらウィルスをそれぞれ HEK293 細胞に感染させて蛋白を発現させ、そこから membrane vesicle を調製した。機能は、inside-out vesicle における ATP-dependent なベシクルへの基質の取り込みで評価を行った。評価に用いた基質は、³H 標識された ES, dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), methotrexate (MTX), p-aminohippuric acid (PAH) を用いた。また、各クローンの局在の解析については、ウィルスを極性細胞である LLC-PK1 細胞に感染させることで変異体を発現させ、immunocytochemistry の手法を用いて、共焦点レーザー顕微鏡にて局在を観察した。

1-3) statins の脳内からの排出機構の解析

³H 標識体の pravastatin と pitavastatin を用いて、brain efflux index (BEI) 法を用いて、ラット脳内に投与した両薬物が、血中に排出される時間推移を観察した。また、非透過

性のマーカーとしては、 ^{14}C 標識 carboxyl-inulin を用いた。さらに、それらの輸送を、PAH, taurocholate (TCA), digoxin を用いて阻害を試みた。また、脳からの排出に関与すると思われる候補トランスポーターである rat Oat3, Oatp2 発現細胞を用いて、両化合物の輸送を観察した。

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

2-1) OCT1 遺伝子多型とメトホルミンの血糖降下作用；鳥取大学病院内科に通院する MT 服用患者 33 名を対象とした。HbA1c の変動と医師の診察に基づき、レスポonder (n=24) とノンレスポonder (n=9) に層別した。患者より得たゲノム DNA を試料に、OCT1 遺伝子の多型解析を行い、変異の関与を検討した。さらに、プールヒト肝組織中に発現する OCT1 mRNA 発現量と変異との関連も併せて検討した。

2-2) MDR1 プロモーター変異の機能解析；プロモーター領域の変異をハプロタイプで層別し、ヒト胎盤での p-糖タンパク発現量への関与を検討した。さらに、luciferase assay, mobility shift assay, メチル化解析により、機序を検討した。

3) ヒト胎盤細胞を用いた新治療開発のための基礎的検討

3-1) hPDMC から産生される hVEGF 以外の物質の検討

hPDMC が産生する hVEGF 以外の血管新生因子について検討するために、hPDMC の mRNA を抽出し、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、アンジオポイエチン 1, アンジオポイエチン 2、血小板由来成長因子 (PDGF) の RT-PCR を行う。これで検出できる因子については、培養上清で ELISA を用いて蛋白濃度を測定する。

3-2) hPDMC 細胞溶解液の創傷治癒への効果

hPDMC の細胞溶解液を親水軟膏に混合しマウスの創傷モデルに投与する。麻酔下でマウスの背側の皮膚を 2 カ所 (左背側と右背側) それぞれ 15mm 角に切り取り、一方に hPDMC 溶解液を含む親水軟膏を塗布し、対側に対照の軟膏を塗布する。30 分間静置し、成長因子が傷害部に十分作用するようにする。創傷が治癒する約 10 日後に至るまで、72 時間毎にマウスを麻酔し、デジタルカメラで皮膚欠損部位を撮影する。コンピュータを用いて画像から皮膚欠損部の面積を計算し、対照と比較する。

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

4-1) ABC トランスポーター遺伝子の発現量

多様性

単塩基多型情報を用いてアレル間の発現量の違いを検出することができる。多型部位を含む DNA 配列をシーケンサーを用いて配列決定すれば、それぞれのアレルからのシグナルが 1:1 で検出される。cDNA 配列中に存在する多型を利用してそれぞれのアレルから読まれる RNA 量を比較することができる。また、SNP 検出用マイクロアレイをもちいてトランスポーター遺伝子アレル間の発現量比について検討した。2 枚の SNP 検出用マイクロアレイは各 SNP のアレルごとに相補的になるように設計されており、ハイブリダイゼーション後、シグナルに基づいて試料の SNP を判定し、また各アレルの発現量をシグナル強度又はシグナル比に基づいて比較することができる。

不死化リンパ球から抽出した DNA および RNA を用いて上記実験を行った。

4-2) 質量分析による遺伝子発現量多様性解析法の開発

単塩基多型 (SNP) に由来する質量の差を利用してアレルを識別することにより、アレル間の遺伝子発現の変化を定量的に検出する方法を開発した。DNA を鋳型としてプライマーエクステンションを行う際に SNP 部位を含めれば、産生される配列の質量を比較することによりゲノタイピングを行うことが可能である。一方、cDNA を鋳型として同様の反応を行うことにより、RNA 量のアレル間の違いを検出することが可能である。

SNP 部位を含めてプライマーエクステンションし、ddNTP を取り込ませることにより伸長反応を停止させる。産物をマトリックス上にスポットした後に飛行時間型 MS (Sequenom) によりそれぞれのアレルからの産生物を定量した。

(倫理面への配慮)

1-1) のヒト肝臓ブロックは、HAB 研究機構から供与されたものであり、これらのサンプルは、既に適切に書面による informed consent がとられたサンプルであることが確認されており、倫理的に問題のないサンプルである。2-1, 2-2) については、遺伝子解析に使用した DNA およびヒト臓器は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。さらに、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。4-1, 4-2) については、本年度の研究計画では臨床情報を有していない DNA および RNA 試料についてゲノタイピングを施

行した。なおEBVにより不死化したリンパ球株はATCCより購入したものであり、連結不能匿名化されている。本研究は東京大学先端科学技術研究センター研究倫理審査委員会の承認を受けている。

C.研究結果

1-1) ヒト肝臓の有機アニオンの胆汁排泄に関与するトランスポーターの寄与の解析

モデル化合物4種の共発現系における経細胞輸送を観察したところ、EGは、OATP1B1/MRP2, OATP1B1/MDR1, OATP1B1/BCRPすべての発現系においてbasalからapical方向への経細胞輸送が観察された。一方、ESも、3種の共発現系において方向性のある輸送が観察されているが、OATP1B1単独発現系でも反対方向の輸送と比較して有意な輸送が観察されており、それらを考慮すると、MRP2を発現したことによる輸送のenhancementは小さく、あまり良好な基質でないことが示唆された。一方、HMG-CoA還元酵素阻害薬同士の比較では、pravastatinは、OATP1B1/MRP2における輸送は相対的に見て大きいという結果を得たが、cerivastatinにおいては、すべての発現系でほぼ同等の経細胞輸送が観察された。さらに、経細胞輸送を細胞内濃度で除した細胞からapical側への排出クリアランスを算出したところ、EG, pravastatinは、ともにMRP2による輸送が大きい一方で、ESでは、BCRPが、cerivastatinでは、MRP2とMDR1がほぼ同等の輸送能力を示した。さらに、ヒトCMVと共発現系の間での発現量の比較をしてその比(CMV/発現系)を算出したところ、MDR1>MRP2>BCRPの順であった。

1-2) ヒトBCRP遺伝子多型変異体のin vitro機能解析

BCRP多型変異体をLLC-PK1細胞にアデノウイルスを用いて発現させたところ、全種類で発現が確認され、その局在は、S441Nを除く変異体においては、生理的な局在と同じapical側であったのに対して、S441N多型変異体については、細胞内コンパートメントへの局在が観察された。また、Western blotによる発現量の比較では、ウイルスあたりの発現量では、S441NとQ141K変異体で有意に低いという結果を示した。さらに、HEK293細胞にBCRP多型変異体を発現させ、そのベシクルを調製し、ATP-dependentな輸送を観察したところ、ES, DHEAS, MTX, PAHの輸送能力は、発現量でnormalizeした単位BCRPあたりの輸送クリアランスで比較すると、(発現の極端に少な

いS441Nを除いて)Q141Kも含めて同じ値を示した。また、V12M, Q141KともESの輸送の親和性は、野生型と比較して有意差は観察されなかった。

1-3) statinsの脳内からの排出機構の解析

rat Oat3, rat Oatp2発現系による輸送実験の結果から、pravastatin, pitavastatinはともに両トランスポーターにより輸送されることが明らかとなった。また、その輸送活性は、rat Oat3については、両化合物でクリアランスに大きな差は見られなかったが、rat Oatp2については、pitavastatinの方が、pravastatinと比較して大きな輸送が観察された。一方で、脳内から排出については、濃度依存的に阻害され、また、有機アニオン系の輸送の阻害剤であるprobenecidによりほぼ完全に輸送された。また、PAHによる阻害の結果、pitavastatin, pravastatinともに、部分的な阻害が見られた。一方、digoxinやTCAによりpitavastatinの輸送は、ほぼ完全に阻害されたものの、pravastatinの輸送は約半分しか阻害されなかった。

2-1) OCT1遺伝子多型とメトホルミン(MT)の血糖降下作用

MTのレスポonderとノンレスポonderの遺伝子解析比較の結果、V408M変異の頻度がノンレスポonder群で高かった。両群を区別する要因を明らかにする目的で、判別関数分析を行った。その結果、年齢(係数=0.09)、BMI(body mass index, 0.23)、高脂血症治療薬服用(2.25)が正の関与であった。すなわち、高脂血症治療薬の投与を受ける肥満のある高齢者でMTが有効であることを意味し、従来の臨床で使用経験を支持する結果と言える。遺伝子関連では、V408M変異の負の関与が認められた。そこで、ヒト肝におけるOCT1 mRNA発現量への関与を検討した結果、本変異の存在により発現量の低下が認められた。

2-2) MDR1プロモーター変異の機能解析

MDR1遺伝子プロモーター領域、約2kbの多型解析を行った。その結果、10箇所2ないし5塩基の欠損を含む変異を同定した。さらに、ハプロタイプ解析を行った結果、10種類のハプロタイプを認めた。ヒト肝および胎盤に発現するMDR1 mRNA量との関連を評価した結果、2つのhaplotypeで有意な発現量の増加が観察された。luciferase assay, lectrophoretic mobility shift assay, メチル化解析の結果、T-1517aC、T-1017aC、T-129Cが転写に重要な部位であることが明らかとなった。さらに、これらのプロモーター変異は、C3435T変異とは独立の変異であった。

3-1) hPDMC から産生される hVEGF 以外の物質の検討

RT-PCR の結果、bFGF とアンジオポイエチン 1 mRNA の発現があることが判明した。ELISA を用いて bFGF を測定したところ、細胞培養上清中には検出されなかったが、細胞溶解液に高濃度に存在することが明らかとなった。

3-2) hPDMC 細胞溶解液の創傷治癒への効果

皮膚切除 10 日後に計測した欠損皮膚は、対照群で $99.1 \pm 11.1 \text{mm}^2$ (mean \pm SE、 $n=20$) に対し hPDMC 投与群では $70.5 \pm 6.4 \text{mm}^2$ であった。hPDMC 投与群は対照群に比較して有意に皮膚損傷を改善した。

4-1) ABC トランスポーター遺伝子の発現量多様性

リンパ球においてアレル間の遺伝子発現量が 3 倍以上異なるトランスポーター遺伝子が同定された。

4-2) 質量分析による遺伝子発現量多様性解析法の開発

DNA を鋳型として測定した場合にはアレル間のシグナルの比率はほぼ 1:1 であった。一方、cDNA を鋳型とした場合にはアレル間の発現が 10 倍以上異なるサンプルも存在した。

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

ヒトにおける薬物の胆汁排泄に関わるトランスポーターとしては、かつては、主に脂溶性が高く中性・塩基性の化合物を輸送する MDR1、アニオン性の化合物を広範に基質として認識する MRP2 のように薬物の性質によりある程度分類がされると考えられてきたが、近年、主に硫酸抱合体を良好な基質とする BCRP が、広範なアニオン性化合物を認識することがわかってきたこと、さらには、MDR1 にも、一部の有機アニオン (例えば、fexofenadine など) が、認識されることが報告されており、有機アニオンの輸送には、これらすべてのトランスポーターが協調的に胆汁排泄に関与していることが考えられた。一方、有機アニオンは、電荷的にも細胞内に入れることが難しく、ゆえに排泄側のトランスポーターの機能解析が困難であった。我々は、これまで、有機アニオンを広範な基質として認識する肝取り込みトランスポーター OATP1B1 と輩出トランスポーター MRP2 を極性細胞に発現させ、basal から apical 方向への輸送が観察されるような共発現系を構築してきた。

その系を用いて寄与率の検討を試みた結果、各基質により排出トランスポーターの相対的な輸送活性は、異なることが示され、例えば、ほぼ同一骨格を有する HMG-CoA 還元酵素阻害薬、pravastatin と pitavastatin では、排出トランスポーターの寄与が異なることが示唆され、これらが、今後遺伝子多型や薬物間相互作用、病態等による発現変動時に薬物動態に与える影響が異なる可能性を示唆しており、臨床でのこれらの意味づけが重要になってくると考えられる。また、EG, pravastatin は、これまでの当教室での検討において、Mrp2 を欠損したラットである EHBR において胆汁排泄が起こらなくなることから、Mrp2 が major なトランスポーターであることが示唆されており、この共発現系においても、EG, pravastatin がともに MRP2 における排出クリアランスが大きかったことと合致しており、興味深い結果である。ただ、ヒト CMVs と共発現系との間の発現量の比較においては、MDR1 の単位蛋白量あたりの発現量が、相対的に見て、CMV で多く、MRP2 がほぼ同等、BCRP が CMV ではほとんど検出されないくらいであったことから、結果として、すべての基質について、計算上 MDR1 が major なトランスポーターであるという結果となった。ここについては、肝ブロックでの保存条件、CMV 調製中のトランスポーターの安定性の違いなどクリアすべき問題は多く、現時点で明確な結論は出せない。しかしながら、化合物間で相対的な寄与を見積もることは今回構築した共発現系よりできるため、今後さらに事例を増やし、より正確な寄与率の推定へ向けて方法論を考察していく予定である。

BCRP の多型に関しては、S441N は、非常に頻度の低い多型であるが、細胞内局在が細胞内であり、また、発現量が非常に少ないことから、おそらく、小胞体において、一連の蛋白品質管理機構 (シャペロンなど) に認識されてトラップされ、成熟できない可能性が示唆される。一方、他の多型変異体は、局在には影響を与えなかった。しかし、発現量で比較をすると、Q141K については、有意にウィルスタイターあたりの発現量は低下していることが明らかとなり、併せて、実際にヒト胎盤においても、Q141K 保持者において、有意に発現量が低下していることが示されており、我々の結果が、単なる *in vitro* 実験系による artifact ではないことを支持している。一方、機能を膜ベシクルを用いて調べたところ、今回用いた 4 種類の基質に関しては、いずれの変異体

においても単位 BCRP あたりの輸送クリアランスは、いずれも同じであり、機能には変異が影響を与えないことが示唆される。従って、Q141K は、機能・局在には影響を与えないが、発現量が有意に低下しており、その結果、機能低下が認められる多型であると考えられた。BCRP は、肝臓・腎臓・小腸・脳・胎盤・乳腺に発現が認められ、薬物の吸収、代謝、分布に栄養を与える可能性がある。また、Q141K については、西洋人と比較して、日本人では頻度が高く、10 名に 1 人はホモでこの変異アレルを有していることから、この保有者では薬物動態が有意に変化する可能性が考えられ、今後臨床との対応を探っていくことが必要であると思われる。

statins の脳内からの排出機構についての解析では、脳内からの statin の排出は、2 化合物とも、飽和性を示し、probenecid でほぼ完全に阻害されたことから、有機アニオン輸送系を介して能動的に排出されていることが示唆された。また、同一の statins でも、阻害剤の感受性が異なることから、排出機構の相対的な寄与が異なる可能性が示唆される。pravastatin に関しては、阻害剤のパターンから Oat3, Oatp2 による排出の寄与はほぼ同等であると考えられる一方で、pitavastatin では、おそらく Oatp2 が主要な寄与を占めている可能性が示唆された。このことは、Oat3, Oatp2 発現系を用いた輸送実験の結果から、Oatp2 による輸送クリアランスが、pitavastatin の方が、pravastatin の輸送よりも有意に大きかったことと矛盾しない。よって、同系統の薬物でも脳内濃度を決定する排出輸送系が違うということが示唆されており、今後、他の薬物についても、寄与の違いが見られるか、またそれらによって、どのような臨床的な所見の違いが生まれるかについて、さらなる検討が求められると考えている。

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

MT は、肥満のある 2 型糖尿病患者に常用されるピグアナイド系インスリン抵抗性改善薬であるが、以前より、肝抵抗性を示すノンレスポonder の存在が問題視されていた。2-1) では MT の肝取り込みを規定する OCT 遺伝子変異の関与を想定した。2-2) では MDR1 遺伝子変異の重要性は認識されているものの、その機能評価には一定の知見がないことから、プロモーター変異の関与を新たに着目して検討を加えた。いずれの検討でも、新たに変異の関与が示唆された。OCT1 遺伝子では、ヒト肝での mRNA 発現

量の低下を伴う V408M 変異の関与が認められた。本変異の機能への影響についての研究報告は少なく、今後の追加検討が待たれる。MDR1 プロモーター変異の詳細な検討を加えた結果、10 種の haplotype を同定し、2 種類の重要性が示唆された。MDR1 遺伝子では、3435 位と 2677 位の変異が目されており、議論されているところであるが、興味あることに、2 種類の haplotype は、これらの SNPs と独立して存在し、機能することが明らかとなった。このことから、cording 領域に加え、promoter 領域の変異の考慮も重要であらねことが示唆される。以上の結果より、OCT1、MDR1 遺伝子に見る多型は、それぞれが関与する医薬品の効果や体内動態の個人差の原因となると予想される。3) ヒト胎盤細胞を用いた新治療開発のための基礎的検討

昨年度までに hPDMC の細胞移植がマウス下肢虚血モデルで血流を改善することを示したが、細胞移植は手間のかかる治療であり、可能であればより簡便な治療を開発する必要がある。また hPDMC からは hVEGF 以外の血管新生因子や成長因子が産生されている可能性があったため、本研究を立案した。その結果 bFGF やアングイポイエチン 1 も産生していることが明らかとなった。これらの事実から、hPDMC の溶解液を含む軟膏が開発できるのではないかと考え、親水軟膏に溶解液を混合してマウス皮膚損傷モデルに投与したところ、治癒の促進が認められた。

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

不死化リンパ球 RNA の解析では発現量に大きなばらつきが認められる ABC トランスポーター遺伝子が認められた。同一家系からの検体を解析することにより、発現量多様性が遺伝性のものであるのか否かについて今後明らかにされるものと期待される。また、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同様な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

OATP1B1/MDR1, OATP1B1/BCRP, OATP1B1/MRP2 共発現系を用いて、有機アニオン化合物の経細胞輸送を観察し、各化合物により、排出トランスポーターの寄与が異なることを示し、これら共発現系が相対的な排出トランスポーターの寄与を決める実験系として有用であることを示した。

BCRP 変異体発現系による *in vitro* 解析の結果、日本人で高頻度に認められる Q141K 変異については、単位 BCRP あたりの輸送活性には変化はないが、発現量として低下することで、活性の低下が野生型と比較して起きている可能性が示唆された。

statins の脳からの排出の解析から、pravastatin, pitavastatin は、能動的に排出を受けており、さらに、両薬物の排出に関与するトランスポーターの相対的な寄与が異なることが示された。

OCT1 遺伝子の V408M 変異や MDR1 プロモーター変異である haplotype3, 4 は、薬物などの基質輸送能の低下や亢進を生じ、効果や体内動態にみる個人差の原因となることが示唆される。

hPDMC は hVEGF 以外にも bFGF やアンジオポイエチン 1 を産生し、hPDMC の溶解液を含む軟膏は、マウス皮膚損傷モデルの治療を促進させた。

SNP を利用してトランスポーター遺伝子の発現量多様性を検出できた。質量分析法を用いることによりアレル間の遺伝子発現量の変動を検出することに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Iwai M, Suzuki H, Ieiri I, Otsubo K and Sugiyama Y Functional analysis of single nucleotide polymorphisms of hepatic organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) Pharmacogenetics, 14, 749-757 (2004)

Kondo C, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada JI, Kobayashi D, Ieiri I, Mine K, Otsubo K and Sugiyama Y Functional analysis of SNPs variants of BCRP/ABCG2 Pharm Res, 21, 1895-1903 (2004)

Shitara Y, Hirano M Sato H and Sugiyama Y Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1:SLC21A6)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of

cerivastatin: analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil J Pharmacol Exp Ther, 311, 228-236 (2004)

Shitara Y, Hirano M, Adachi Y, Itoh T, Sato H and Sugiyama Y In vitro and in vivo correlation of the inhibitory effect of cyclosporin A on the transporter-mediated hepatic uptake of cerivastatin in rats Drug Metab Dispos, 32, 1468-1475 (2004)

Ozawa N, Shimizu T, Morita R, Yokono Y, Ochiai T, Munosada K, Ohashi A, Aida Y, Hama Y, Taki K, Maeda K, Kusuhara H and Sugiyama Y Transporter database, TP-Search: a web-accessible comprehensive database for research in pharmacokinetics of drugs Pharm Res, 21, 2133-2134 (2004)

Hirano M, Maeda K, Shitara Y and Sugiyama Y Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans J Pharmacol Exp Ther, 311, 139-146 (2004)

Kikuchi R, Kusuhara H, Abe T, Endou H and Sugiyama Y Involvement of multiple transporters in the efflux of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors across the blood-brain barrier J Pharmacol Exp Ther, 311, 1147-1153 (2004)

Shitara Y, Sato H and Sugiyama Y Evaluation of Drug-Drug Interaction in the Hepatobiliary and Renal Transport of Drugs Annu Rev Pharmacol Toxicol, in press (2005)

前田和哉、杉山雄一 遺伝子多型と薬物の効果の個人差 Molecular Medicine, 41, 344-354 (2004)

前田和哉、杉山雄一 トランスポーターの遺伝子多型と薬物動態の個人差 医学のあゆみ, 209, 357-363 (2004)

Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, Takane H, Nishizato Y, Irie S, Urae A, Kawabata K, Higuchi S, Otsubo K, Sugiyama Y. Influence of common variants in the pharmacokinetic genes (OATP-C, UGT1A1, and MRP2) on serum bilirubin levels in healthy subjects. Hepatol Res. 30, 91-95 (2004)

Kobayashi D, Ieiri I, Hirota T, Takane H, Maegawa S, Kigawa J, Suzuki H, Nanba E, Oshimura M, Terakawa N, Otsubo K, Mine K, Sugiyama Y. Functional assessment of abcg2 (bcrp) gene polymorphisms to protein expression in human placenta. Drug Metab Dispos. 33, 94-101 (2005)

Takane H, Kobayashi D, Hirota T, Kigawa J, Terakawa N, Otsubo K, Ieiri I. Haplotype-oriented genetic analysis and functional assessment of promoter variants in the

- MDR1 (ABCB1) gene. *J Pharmacol Exp Ther.* 311, 1179-1187 (2004)
- Kuwabara K, Nakaoka T, Sato K, Nishishita T, Sasaki T, Yamashita N. Differential Regulation of Cell Migration and Proliferation through Pyk2 in Endothelial Cells. *Endocrinology* 145, 3324-30 (2004)
- Tani K, Azuma M, Nakazaki Y, Oyaizu N, Hase H, Ohata J, Takahashi K, OiwaMonna M, Hanazawa K, Wakumoto Y, Kawai K, Noguchi M, Soda Y, Kunisaki R, Watari K, Takahashi S, Machida U, Satoh N, Tojo A, Maekawa T, Eriguchi M, Tomikawa S, Tahara H, Inoue Y, Yoshikawa H, Yamada Y, Iwamoto A, Hamada H, Yamashita N, Okumura K, Kakizoe T, Akaza H, Fujime M, Clift S, Ando D, Mulligan R, Asano S. Phase I Study of Autologous Tumor Vaccines Transduced with the GM-CSF Gene in Four Patients with Stage IV Renal Cell Cancer in Japan: Clinical and Immunological Findings. *Molecular Therapy* 10, 799-816 (2004)
- Watanabe T, Miyahara Y, Akishita M, Nakaoka T, Yamashita N, Iijima K, Kim H, Kozaki K and Ouchi Y. Inhibitory effect of low-dose estrogen on neointimal formation after balloon injury of rat carotid artery. *European Journal of Pharmacology* 502, 265-70 (2004)
- Watanabe T, Akishita M, Nakaoka T, He H, Miyahara Y, Yamashita N, Wada Y, Aburatani H, Yoshizumi M, Kozaki K and Ouchi Y. Caveolin-1, Id3a and two LIM protein genes are upregulated by estrogen in vascular smooth muscle cells. *Life Science*, 75, 1219-29 (2004)
- Nishishita T, Ouchi K, Zhang X, Inoue M, Inazawa T, Yoshiura K, Kuwabara K, Nakaoka T, Watanabe N, Igura K, Takahashi TA and Yamashita N. A potential pro-angiogenic cell therapy with human placenta-derived mesenchymal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 325, 24-31 (2004)
- Sato K, Nakaoka T, Yamashita N, Yagita H, Kawasaki H, Morimoto C, Baba M and Matsuyama T. TRAIL Protects Mice from Acute Graft-Versus-Host Disease and Leukemia Relapse Mediated Through the Peripheral Deletion of Pathogenic T Cells and Leukemia Cells. *Journal of Immunology*, in press (2005)
- Iwata T, Fujita T, Hirao N, Matsuzaki Y, Okada T, Mochimaru H, Susumu N, Matsumoto E, Sugano K, Yamashita N, Nozawa S, and Kawakami Y. Frequent immune responses to a cancer/testis antigen CAGE in patients with microsatellite instability positive endometrial cancer. *Clinical Cancer Research*, in press (2005)
- Kano M, Tsutsumi S, Kawahara N, Wang Y, Mukasa A, Kirino T, Aburatani H. A meta-clustering analysis indicates distinct pattern alteration between two series of Gene Expression profiles for induced ischemic tolerance in rats. *Physiological Genomics*. in press
- Komura D, Nakamura H, Tsutsumi S, Aburatani H, Ihara S. Multidimensional support vector machines for visualization of gene expression data. *Bioinformatics*. 21(4):439-44. 2005
- Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T, Ohki M, Aburatani H, Nagao M, Sugimura T, Nakagama H. Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Carcinogenesis*. 25(8): 1495-505. 2004
- Nakatani N, Aburatani H, Nishimura K, Semba J, Yoshikawa T. Comprehensive expression analysis of a rat depression model. *Pharmacogenomics J.* 4(2):114-26. 2004
- Kawahara N, Wang Y, Mukasa A, Furuya K, Shimizu T, Hamakubo T, Aburatani H, Kodama T, Kirino T. Genome-wide Gene Expression Analysis for Induced Ischemic Tolerance and Delayed Neuronal Death Following Transient Global Ischemia in Rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24(2): 212-223. 2004
- Joo A, Aburatani H, Morii E, Iba H, Yoshimura A. STAT3 and MITF cooperatively induce cellular transformation through upregulation of c-fos expression. *Oncogene*. 23(3): 726-34. 2004
- 油谷浩幸 DNAチップの臨床応用 現代医療 36(5): 1107-1114, 2004
- 油谷浩幸 ゲノム発現からのアプローチ Molecular Medicine 41 臨時増刊ヒトゲノム 221-229, 2004
- 油谷浩幸 ゲノム機能解析ツールとしてのDNAマイクロアレイ 蛋白質核酸酵素 49(11): 1853-1858, 2004
- 油谷浩幸 DNAチップのがん治療研究への応用 血液・免疫・腫瘍 9(2):175-180, 2004
- 油谷浩幸 マイクロアレイの癌治療研究への応用 実験医学 22(14):1920-1926, 2004
- 星田有人, 油谷浩幸 遺伝子発現解析とデータ解析 実験医学 23(4):530-536, 2005
2. 学会発表
- Hiroyuki Kusuhara Influence of genetic polymorphism of transporters on the tissue distribution and elimination of drugs (invited) 1st International Symposium on Pharmacogenomics, Busan, Korea, 2004.2
- Hiroyuki Kusuhara Coordination of Uptake and Efflux Transporters in Drug Disposition (invited)

LogP2004 Symposium Physicochemical and Biological Profiling in Drug Research, ETH Zurich, Switzerland, 2004.3

Hiroyuki Kusuhara Vectorial transport in the liver and kidney (invited)

GPEN2004, Kyoto, Japan, 2004.5

Yuichi Sugiyama Hepatic Drug Metabolism / Transporters and their Effect on Bioavailability (invited)

FIP, AAPS and CAP joint International Conference on Scientific and Regulatory Challenges in Pharmaceutical Science, Nanjing, China, 2004.6

設楽悦久、佐藤均、平野雅、杉山雄一 高脂血症治療薬セリバスタチンとゲムフィブロジル（フィブラート）併用時の薬物間相互作用
第12回肝病態生理研究会 千葉 2004.6

清水真紀、布施香織、奥平和穂、西垣隆一郎、前田和哉、楠原洋之、杉山雄一 抗アレルギー薬 fexofenadine の肝取り込み過程における OATP ファミリートランスポーターの関与
第12回肝病態生理研究会 千葉 2004.6

田原晴信、楠原洋之、杉山雄一 フェキソフェナジンの胆汁排泄メカニズムの解析
第12回肝病態生理研究会 千葉 2004.6

松島総一郎、前田和哉、近藤千尋、平野雅、佐々木誠、鈴木洋史、杉山雄一 共発現系を用いたヒト胆管側膜に発現するトランスポーターの寄与率の検討
第12回肝病態生理研究会 千葉 2004.6

杉山雄一 Hepatic Transporters for xenobiotics and bile acids: Multiplicity, Substrate specificity, Genetic polymorphism. (特別講演)
第11回肝細胞研究会 宇部 2004.7

杉山雄一 胆汁酸トランスポーター研究の最前線 ―肝臓、消化管における役割― (特別講演)
第3回東日本胆汁酸研究会 東京 2004.7

Yuichi Sugiyama Transporters & Therapeutic Promise (Plenary lecture)

The 8th World Congress on Clinical Pharmacology & Therapeutics 2004, Brisbane, Australia, 2004.8

杉山雄一 医薬品の探索・開発における薬物トランスポーター研究の重要性 (特別講演)
第6回応用薬理シンポジウム 新潟 2004.8

杉山雄一 薬物治療の最適化のためのトランスポーター研究：薬物間相互作用、遺伝子多形の解析 (特別講演)
第25回日本臨床薬理学会 静岡 2004.9

杉山雄一 抗がん剤の体内動態に関わる薬物トランスポーター：基質特異性、薬物間相互作用、遺伝子多型 (特別講演)
第63回日本癌学会学術総会 福岡 2004.9

Kazuya Maeda Importance of OATP1B1 (OATP-C/OATP2) in the clearance of drugs: analysis of genetic polymorphisms and its contribution to the whole body clearance of drugs (invited)

Hepatology Symposium (Neues aus der Hepatologie 2004), Zurich, Switzerland, 2004.10

Yuichi Sugiyama Drug Transporter Polymorphisms and Pharmacokinetics (invited)

Gordon Conference; Membrane Transport Proteins, Les Diablerets, Switzerland, 2004.10

設楽悦久、平野雅、佐藤均、杉山雄一 高脂血症治療薬セリバスタチンとゲムフィブロジルの薬物間相互作用機序の解明 (シンポジウム)
第19回日本薬物動態学会年会 金沢 2004.11

前田和哉、家入一郎、保田国伸、藤野明治、藤原博明、大坪健司、楠原洋之、杉山雄一 日本人健常人におけるプラバスタチン、テモカプリル、バルサルタンの薬物動態に与える OATP1B1(OATP-C/OATP2)*1b 遺伝子型の影響 (シンポジウム)
第19回日本薬物動態学会年会 金沢 2004.11

平野雅、前田和哉、林久允、楠原洋之、前田和哉 Non-bile acid, pravastatin, can be a substrate for bile salt export pump (BSEP)
第19回日本薬物動態学会年会 金沢 2004.11

清水真紀、布施香織、奥平和穂、西垣隆一郎、前田和哉、楠原洋之、杉山雄一 Contribution of OATP family transporters to the hepatic uptake of fexofenadine
第19回日本薬物動態学会年会 金沢 2004.11

石黒直樹、前田和哉、Thomas Ebner, Willy Roth, 五十嵐隆、杉山雄一 Involvement of OATP families in the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist
第19回日本薬物動態学会年会 金沢 2004.11

松島総一郎、前田和哉、平野雅、近藤千尋、山雄一 ヒト肝臓の胆管側膜における有機アニオン系化合物の排泄に関するトランスポーターの寄与率の検討
第26回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 東京 2004.11

Yuichi Sugiyama Assessment of Transcellular Transport of New Drug Candidates to Predict their Hepatobiliary and Renal Clearances (invited)

The 3rd Annual Drug Discovery & Development Summit, San Diego, USA, 2004.12

山城わかば、前田和哉、平野雅、杉山雄一 選

- 拮抗的 AT1 受容体ブロッカー valsartan のヒト肝臓における取り込み・排泄に関わるトランスポーターの同定と寄与の解明
 日本薬剤学会創立 20 周年記念大会 東京 2005.3
 北村 史司、前田 和哉、杉山 雄一 HMG-CoA 還元酵素阻害薬 ロスバスタチンの肝消失に関わるトランスポーターの同定
 日本薬剤学会創立 20 周年記念大会 東京 2005.3
 Ieiri I and Otsubo K. Genetic polymorphisms in drug transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy. (invited)
 7th International ISSX (International Society for the study of xenobiotics) meeting., Vancouver, Canada, 2004.8
 Shikata E, Ieiri I, Takane H, Koide T, Yamamoto R, Ikeda T, Sugiyama Y and Otsubo K. Human organic cation transporter (hOCT1) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin.
 第 19 回日本薬物動態学会, 金沢, 2004.11
 油谷浩幸 International symposium "The front line of cancer therapy" Discovery of a new biomarker for gastroenterological cancers
 第 90 回日本消化器病学会, 仙台, 2004.4
 油谷浩幸 Integrated genomics in cancer research
 油谷浩幸 がんのシステムバイオロジーミニシンポジウム, 東京, 2004.5
 油谷浩幸 アレイを用いた機能ゲノム解析
 第 14 回難病治療研究会, 東京, 2004.7
 油谷浩幸 2nd International Symposium on New Frontiers of Systems Biology and Medicine Novel Biomarker discovery through cancer genomics
 LSBM 国際シンポジウム, 東京, 2004.7
 油谷浩幸 肝発癌におけるゲノム変異の統合的解析
 第 11 回箱根肝臓シンポジウム, 箱根, 2004.7
 油谷浩幸 ゲノム解析の癌研究への応用
 BioJapan2004 シンポジウム「ゲノム・プロテオーム解析の癌診療へのインパクト」, 東京, 2004.9
 油谷浩幸 アレイ解析技術と癌研究
 第 11 回群馬 clinical Oncology Research 勉強会, 前橋, 2004.11
 油谷浩幸 癌の分子診断と治療への展開
 三菱化学ヘルスケアフォーラム, 東京, 2004.11
 Hiroyuki Aburatani International Conference on Fatigue Science 2005 Gene Expression Signatures in CFS patients
 国際疲労学会, 軽井沢, 2005.2
 Hiroyuki Aburatani The University of Tokyo International Symposium - Frontiers in Drug Development. Genomic Technology in Drug Development
 東京大学国際シンポジウム, 東京, 2005.2
 油谷浩幸 アレイ解析による high throughput biology
 第 13 回広島大学・がんセミナー学術講演会, 広島, 2005.3
 油谷浩幸 がんゲノム情報の網羅的解析
 第 7 回 Tokyo Urological Research Conference (TURC), 東京, 2005.3
 G. 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 有機アニオンのヒト肝臓の排泄に関与するトランスポーターについて個々のトランスポーターの寄与の解析を行うために、有機アニオンの取り込みトランスポーター OATP1B1(OATP2)と排泄側トランスポーターとして知られている MDR1, MRP2, BCRP のいずれかを両方発現する共発現系を構築し、各種有機アニオンの経細胞輸送ならびに排出クリアランスを測定した。またヒト canalicular membrane vesicles (CMVs)をヒト肝臓ブロックより調製し、Western blotにて発現系とヒト CMVs の間で発現量の相対的な比較を行い、寄与を見積もった。また、ヒト BCRP の既知の遺伝子多型を有する変異体7種の発現系を構築し、うち2つの変異で有意にウィルスあたりの発現量が低下することを示した。HMG-CoA還元酵素阻害薬(statin)の副作用である睡眠障害を理解するため、statinの脳内移行に関与するトランスポーターの寄与を明らかにすべく、Oat3, Oatp2発現細胞を用いた取り込みならびに、brain efflux index (BEI)法による脳からの statin の排出を測定した結果、同系統の薬物である pravastatin と pitavastatin では、脳内からの排出に関与するトランスポーターの寄与が異なることを明らかにした。

A.研究目的

昨年は、ヒト肝臓の血管側に発現する有機アニオン類の取り込みに関与するトランスポーターの寄与を見積もる方法論を提唱したが、今年度は、ヒト肝臓の有機アニオン類の胆汁排泄に関与する排泄トランスポーターの寄与を見積もるべく、取り込みトランスポーター organic anion transporting polypeptide (OATP)1B1 (OATP2/OATP-C)と、肝臓における薬物排出トランスポーターとして主に知られている multidrug resistance (MDR)1, multidrug resistance-associated protein (MRP) 2, breast cancer resistance protein (BCRP)の3種類をそれぞれ極性細胞に発現させた共発現系を構築し、さらにヒト肝臓ブロックから canalicular membrane vesicle (CMV)を調製し、各トランスポーターの発現系と CMV での相対的な発現量を比較し、共発現系での輸送活性を比較することで、ヒト肝臓における排泄トランスポーターの寄与を見積もることを試みた。

また、昨年の OATP1B1 の遺伝子多型の in vitro 解析に引き続き、本年度は、BCRP の遺伝子多型の in vitro 解析系を構築し、既知の遺伝子多型7箇所について、発現、機能、局在の変化について解析を行った。特に BCRP の多型の中でも比較的日本人で頻度が高い Q141K の変異については、過去の報告で、抗がん剤 diflomotecan の血中濃度が Q141K 変異を有する患者で有意に高値を示

すことが知られており、臨床的にも特に日本人において意味のある変異である可能性が高いと考えられる。

また、高脂血症治療薬の代表格である HMG-CoA 還元酵素阻害薬(statins)において、横紋筋融解症の他に、睡眠障害など中枢における副作用が報告されている。また、一方で statins には、最近神経保護作用の可能性の報告もあり、statins の脳移行メカニズムは、statins の適正使用を考える上で重要な因子の一つであると考え。そこで、我々は、脂溶性の異なる2種の statins, pravastatin と pitavastatin を用いて、脳内への取り込みならびに排泄を測定し、同時に阻害剤の感受性を指標として、トランスポーターの寄与を見積もった。

B.研究方法

1) ヒト肝臓の有機アニオンの胆汁排泄に関与するトランスポーターの寄与の解析

本解析には、モデル化合物として、estradiol-17 β -glucuronide (EG), estrone-3-sulfate (ES), pravastatin, cerivastatin の4種の ³H 標識体を用いた。共発現系の構築に関しては、OATP1B1/MRP2 発現系に関しては、当教室で既に構築されているものを解析に用いた。OATP1B1/MDR1 発現系については、MDCKII 細胞に MDR1 が安定発現している細胞 (Dr. Piet Borst (National Cancer Institute, The Netherlands)より提供)

に、OATP1B1 cDNA を含む発現ベクターを導入し、薬剤耐性マーカーを用いてクローン選択を行ったものを用いた。

OATP1B1/BCRP 発現系については、OATP1B1 安定発現 MDCKII 細胞に、BCRP 発現組み換えアデノウイルスを感染させることで、一過性の共発現系として解析に用いた。ヒト CMVs は、ヒト肝ブロック

(HAB(human and animal brigding)研究機構より提供)より常法にて調製した。Western blot については、ヒト CMVs ならびに共発現系の crude membrane fraction を蛋白量を固定して数点ふって行うことで、総蛋白量と、トランスポーターの特異的なバンド濃度が線形性を保っているような量において、相対的な発現量の比較を行った。

2) ヒト BCRP 遺伝子多型変異体の in vitro 機能解析

これまでに知られているヒト BCRP の遺伝子多型 7 種 (V12M, Q141K, A149P, R163K, Q166E, P269S, S441N) について解析を試みた。遺伝子多型変異体は、組み換えアデノウイルスを作製するとき用いるヒト BCRP cDNA を持つシャトルベクターを、site directed mutagenesis の手法を用いて、常法によりターゲット箇所の遺伝子を置換し、それぞれの多型変異体の組み換えアデノウイルスを構築した。これらウイルスをそれぞれ HEK293 細胞に感染させて蛋白を発現させ、そこから membrane vesicle を調製した。機能は、inside-out vesicle における ATP-dependent なベシクルへの基質の取り込みで評価を行った。評価に用いた基質は、³H 標識された ES, dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), methotrexate (MTX), p-aminohippuric acid (PAH) を用いた。また、各クローンの局在の解析については、ウイルスを極性細胞である LLC-PK1 細胞に感染させることで変異体を発現させ、immunocytochemistry の手法を用いて、共焦点レーザー顕微鏡にて局在を観察した。

3) statins の脳内からの排出機構の解析

³H 標識体の pravastatin と pitavastatin を用いて、brain efflux index(BEI)法を用いて、ラット脳内に投与した両薬物が、血中に排出される時間推移を観察した。また、非透過性のマーカーとしては、¹⁴C 標識 carboxyl-inulin を用いた。さらに、それらの輸送を、PAH, taurocholate (TCA), digoxin を用いて阻害を試みた。また、脳からの排出に関与すると思われる候補トランスポーターである rat Oat3, Oatp2 発現細胞を用いて、両化合物の輸送を観察した。

(倫理面への配慮)

ヒト肝臓ブロックは、HAB 研究機構から供与されたものであり、これらのサンプルは、既に適切に書面による informed consent がとられたサンプルであることが確認されており、倫理的に問題のないサンプルである。

C.研究結果

1) ヒト肝臓の有機アニオンの胆汁排泄に関与するトランスポーターの寄与の解析

モデル化合物 4 種の共発現系における経細胞輸送を観察したところ、EG は、OATP1B1/MRP2, OATP1B1/MDR1, OATP1B1/BCRP すべての発現系において basal から apical 方向への経細胞輸送が観察され、特に、OATP1B1/MRP2 における輸送が大きく観察された。一方、ES も、3 種の共発現系において方向性のある輸送が観察されているが、OATP1B1 単独発現系でも反対方向の輸送と比較して有意な輸送が観察されており、それらを考慮すると、MRP2 を発現したことによる輸送の enhancement は小さく、あまり良好な基質でないことが示唆された。一方、HMG-CoA 還元酵素阻害薬同士の比較では、pravastatin は、OATP1B1/MDR1, OATP1B1/BCRP における経細胞輸送は非常に小さく、OATP1B1/MRP2 における輸送は相対的に見て大きいという結果を得たが、cerivastatin においては、すべての発現系でほぼ同等の経細胞輸送が観察された。さらに、経細胞輸送を細胞内濃度で除いた細胞から apical 側への排出クリアランスを算出したところ、EG, pravastatin は、ともに MRP2 による輸送が大きい一方で、ES では、BCRP が、cerivastatin では、MRP2 と MDR1 がほぼ同等の輸送能力を示した。さらに、ヒト CMV と共発現系の間での発現量の比較をしてその比 (CMV/発現系) を算出したところ、MDR1>MRP2>BCRP の順であった。

2) ヒト BCRP 遺伝子多型変異体の in vitro 機能解析

BCRP 多型変異体を LLC-PK1 細胞にアデノウイルスを用いて発現させたところ、全種類で発現が確認され、その局在は、S441N を除く変異体においては、生理的な局在と同じ apical 側であったのに対して、S441N 多型変異体については、細胞内コンパートメントへの局在が観察された。また、Western blot による発現量の比較では、ウイルスあたりの発現量では、S441N と Q141K 変異体で有意に低いという結果を示した。さらに、HEK293 細胞に BCRP 多型変異体を発現させ、そのベシクルを調製し、ATP-dependent な輸送を観察したところ、ES,

DHEAS, MTX, PAH の輸送能力は、発現量で normalize した単位 BCRP あたりの輸送クリアランスで比較すると、(発現の極端に少ない S441N を除いて)Q141K も含めて同じ値を示した。また、V12M, Q141K とも ES の輸送の親和性は、野生型と比較して有意差は観察されなかった。

3) statins の脳内からの排出機構の解析

rat Oat3, rat Oatp2 発現系による輸送実験の結果から、pravastatin, pitavastatin はともに両トランスポーターにより輸送されることが明らかとなった。また、その輸送活性は、rat Oat3 については、両化合物でクリアランスに大きな差は見られなかったが、rat Oatp2 については、pitavastatin の方が、pravastatin と比較して大きな輸送が観察された。一方で、脳内から排出については、濃度依存的に阻害され、また、有機アニオン系の輸送の阻害剤である probenecid によりほぼ完全に輸送された。また、PAH による阻害の結果、pitavastatin, pravastatin ともに、部分的な阻害が見られた。一方、digoxin や TCA により pitavastatin の輸送は、ほぼ完全に阻害されたものの、pravastatin の輸送は約半分しか阻害されなかった。

D. 考察

ヒトにおける薬物の胆汁排泄に関わるトランスポーターとしては、かつては、主に脂溶性が高く中性・塩基性の化合物を輸送する MDR1, アニオン性の化合物を広範に基質として認識する MRP2 のように薬物の性質によりある程度分類がされると考えられてきたが、近年、主に硫酸抱合体を良好な基質とする BCRP が、広範なアニオン性化合物を認識することがわかってきたこと、さらには、MDR1 にも、一部の有機アニオン (例えば、fexofenadine など) が、認識されることが報告されており、有機アニオンの輸送には、これらすべてのトランスポーターが協調的に胆汁排泄に関与していることが考えられた。一方、有機アニオンは、電荷的にも細胞内に入れることが難しく、ゆえに排泄側のトランスポーターの機能解析が困難であった。我々は、これまで、有機アニオンを広範な基質として認識する肝取り込みトランスポーター OATP1B1 と輩出トランスポーター MRP2 を極性細胞に発現させ、basal から apical 方向への輸送が観察されるような共発現系を構築してきた。従って、今回は、この系を用いて、有機アニオン化合物の排出トランスポーターへの認識性の相対的な違い、ならびにヒト CMV を用いた発現量の比較によるヒト肝臓にお

ける排出トランスポーターの寄与について議論を試みた。その結果、各基質により排出トランスポーターの相対的な輸送活性は、異なることが示され、例えば、ほぼ同一骨格を有する HMG-CoA 還元酵素阻害薬、pravastatin と pitavastatin では、排出トランスポーターの寄与が異なることが示唆され、これらが、今後遺伝子多型や薬物間相互作用、病態等による発現変動時に薬物動態に与える影響が異なる可能性を示唆しており、臨床でのこれらの意味づけが重要になってくると考えられる。また、EG, pravastatin は、これまでの当教室での検討において、Mrp2 を欠損したラットである EHBR において胆汁排泄が起こらなくなることから、Mrp2 が major なトランスポーターであることが示唆されており、この共発現系においても、EG, pravastatin がともに MRP2 における排出クリアランスが大きかったことと合致しており、興味深い結果である。ただ、ヒト CMVs と共発現系との間の発現量の比較においては、MDR1 の単位蛋白量あたりの発現量が、相対的に見て、CMV で多く、MRP2 がほぼ同等、BCRP が CMV ではほとんど検出されないくらいであったことから、結果として、すべての基質について、計算上 MDR1 が major なトランスポーターであるという結果となった。ここについては、肝ブロックでの保存条件、CMV 調製中のトランスポーターの安定性の違いなどクリアすべき問題は多く、現時点で明確な結論は出せない。しかしながら、化合物間で相対的な寄与を見積もることは今回構築した共発現系よりできるため、今後さらに事例を増やし、より正確な寄与率の推定へ向けて方法論を考察していく予定である。

BCRP の多型に関しては、S441N は、非常に頻度の低い多型であるが、細胞内局在が細胞内であり、また、発現量が非常に少ないことから、おそらく、小胞体において、一連の蛋白品質管理機構 (シャペロンなど) に認識されてトラップされ、成熟できない可能性が示唆される。一方、他の多型変異体は、局在には影響を与えなかった。しかし、発現量で比較をすると、Q141K については、有意にウィルスタイターあたりの発現量は低下していることが明らかとなり、併せて、本年度の分担研究者の家入らの研究から、実際にヒト胎盤においても、Q141K 保持者において、有意に発現量が低下していることが示されており、我々の結果が、単なる in vitro 実験系による artifact ではないことを支持している。一方、機能を膜ベシクルを用いて調べたところ、今回用いた

4種類の基質に関しては、いずれの変異体においても単位 BCRP あたりの輸送クリアランスは、いずれも同じであり、機能には変異が影響を与えないことが示唆される。従って、Q141K は、機能・局在には影響を与えないが、発現量が有意に低下しており、その結果、機能低下が認められる多型であると考えられた。BCRP は、肝臓・腎臓・小腸・脳・胎盤・乳腺に発現が認められ、薬物の吸収、代謝、分布に栄養を与える可能性がある。また、Q141K については、西洋人と比較して、日本人では頻度が高く、10名に1人はホモでこの変異アレルを有していることから、この保有者では薬物動態が有意に変化する可能性が考えられ、今後臨床との対応を探っていくことが必要であると思われる。

statins の脳内からの排出機構についての解析では、脳内からの statin の排出は、2化合物とも、飽和性を示し、probenecid でほぼ完全に阻害されたことから、有機アニオン輸送系を介して能動的に排出されていることが示唆された。また、同一の statins でも、阻害剤の感受性が異なることから、排出機構の相対的な寄与が異なる可能性が示唆される。pravastatin に関しては、Oat の代表的阻害剤である PAH と、Oatp 類の阻害剤 TCA ならびに Oatp2 の特異的阻害剤 digoxin による阻害の程度が、ともに半分程度であることから、Oat3, Oatp2 による排出の寄与は pravastatin ではほぼ同等であると考えられる。一方で、pitavastatin では、TCA, digoxin によりほぼ完全に排出輸送が阻害されたことから、おそらく Oatp2 が主要な寄与を占めている可能性が示唆された。このことは、Oat3, Oatp2 発現系を用いた輸送実験の結果から、Oatp2 による輸送クリアランスが、pitavastatin の方が、pravastatin の輸送よりも有意に大きかったことと矛盾しない。よって、同系統の薬物でも脳内濃度を決定する排出輸送系が違うということが示唆されており、今後、他の薬物についても、寄与の違いが見られるか、またそれらによって、どのような臨床的な所見の違いが生まれるかについて、さらなる検討が求められると考えている。

E. 結論

OATP1B1/MDR1, OATP1B1/BCRP, OATP1B1/MRP2 共発現系を用いて、有機アニオン化合物の経細胞輸送を観察し、各化合物により、排出トランスポーターの寄与が異なることを示し、これら共発現系が相対的な排出トランスポーターの寄与を決め

る実験系として有用であることを示した。

BCRP 変異体発現系による *in vitro* 解析の結果、日本人で高頻度に認められる Q141K 変異については、単位 BCRP あたりの輸送活性には変化はないが、発現量として低下することで、活性の低下が野生型と比較して起きている可能性が示唆された。

statins の脳からの排出の解析から、pravastatin, pitavastatin は、能動的に排出を受けており、さらに、両薬物の排出に關与するトランスポーターの相対的な寄与が異なることが示された。

F 研究発表

1. 論文発表

Iwai M, Suzuki H, Ieiri I, Otsubo K and Sugiyama Y Functional analysis of single nucleotide polymorphisms of hepatic organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) *Pharmacogenetics*, 14, 749-757 (2004)

Kondo C, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada JI, Kobayashi D, Ieiri I, Mine K, Otsubo K and Sugiyama Y Functional analysis of SNPs variants of BCRP/ABCG2 *Pharm Res*, 21, 1895-1903 (2004)

Shitara Y, Hirano M Sato H and Sugiyama Y Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1:SLC21A6)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of cerivastatin: analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil *J Pharmacol Exp Ther*, 311, 228-236 (2004)

Shitara Y, Hirano M, Adachi Y, Itoh T, Sato H and Sugiyama Y In vitro and in vivo correlation of the inhibitory effect of cyclosporin A on the transporter-mediated hepatic uptake of cerivastatin in rats *Drug Metab Dispos*, 32, 1468-1475 (2004)

Ozawa N, Shimizu T, Morita R, Yokono Y, Ochiai T, Munesda K, Ohashi A, Aida Y, Hama Y, Taki K, Maeda K, Kusuhara H and Sugiyama Y Transporter database, TP-Search: a web-accessible comprehensive database for research in pharmacokinetics of drugs *Pharm Res*, 21, 2133-2134 (2004)

Hirano M, Maeda K, Shitara Y and Sugiyama Y Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans *J Pharmacol Exp Ther*, 311, 139-146 (2004)

Kikuchi R, Kusuhara H, Abe T, Endou H and

Sugiyama Y Involvement of multiple transporters in the efflux of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors across the blood-brain barrier *J Pharmacol Exp Ther*, 311, 1147-1153 (2004)

Shitara Y, Sato H and Sugiyama Y Evaluation of Drug-Drug Interaction in the Hepatobiliary and Renal Transport of Drugs *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, in press (2005)

前田和哉、杉山雄一 遺伝子多型と薬物の効果の個人差 *Molecular Medicine*, 41, 344-354 (2004)

前田和哉、杉山雄一 トランスポーターの遺伝子多型と薬物動態の個人差 *医学のあゆみ*, 209, 357-363 (2004)

2. 学会発表

Hiroyuki Kusuvara Influence of genetic polymorphism of transporters on the tissue distribution and elimination of drugs (invited)

1st International Symposium on Pharmacogenomics, Busan, Korea, 2004.2

Hiroyuki Kusuvara Coordination of Uptake and Efflux Transporters in Drug Disposition (invited)

LogP2004 Symposium Physicochemical and Biological Profiling in Drug Research, ETH Zurich, Switzerland, 2004.3

Hiroyuki Kusuvara Vectorial transport in the liver and kidney (invited)

GPEN2004, Kyoto, Japan, 2004.5

Yuichi Sugiyama Hepatic Drug Metabolism / Transporters and their Effect on Bioavailability (invited)

FIP, AAPS and CAP joint International Conference on Scientific and Regulatory Challenges in Pharmaceutical Science, Nanjing, China, 2004.6

設楽悦久、佐藤均、平野雅、杉山雄一 高脂血症治療薬セリバスタチンとゲムフィブロジル (フィブラート) 併用時の薬物間相互作用

第12回肝病態生理研究会 千葉 2004.6

清水真紀、布施香織、奥平和穂、西垣隆一郎、前田和哉、楠原洋之、杉山雄一 抗アレルギー薬 fexofenadine の肝取り込み過程における OATP ファミリートランスポーターの関与

第12回肝病態生理研究会 千葉 2004.6

田原晴信、楠原洋之、杉山雄一 フェキソフェナジンの胆汁排泄メカニズムの解析

第12回肝病態生理研究会 千葉 2004.6

松島総一郎、前田和哉、近藤千尋、平野雅、佐々木誠、鈴木洋史、杉山雄一 共発現系を用いたヒト胆管側膜に発現するトランスポーターの寄与率の検討

第12回肝病態生理研究会 千葉 2004.6

杉山雄一 Hepatic Transporters for xenobiotics

and bile acids: Multiplicity, Substrate specificity, Genetic polymorphism. (特別講演)

第11回肝細胞研究会 宇部 2004.7

杉山雄一 胆汁酸トランスポーター研究の最前線 —肝臓、消化管における役割— (特別講演)

第3回東日本胆汁酸研究会 東京 2004.7

Yuichi Sugiyama Transporters & Therapeutic Promise (Plenary lecture)

The 8th World Congress on Clinical Pharmacology & Therapeutics 2004, Brisbane, Australia, 2004.8

杉山雄一 医薬品の探索・開発における薬物トランスポーター研究の重要性 (特別講演)

第6回応用薬理シンポジウム 新潟 2004.8

杉山雄一 薬物治療の最適化のためのトランスポーター研究: 薬物間相互作用、遺伝子多形の解析 (特別講演)

第25回日本臨床薬理学会 静岡 2004.9

杉山雄一 抗がん剤の体内動態に関わる薬物トランスポーター: 基質特異性、薬物間相互作用、遺伝子多型 (特別講演)

第63回日本癌学会学術総会 福岡 2004.9

Kazuya Maeda Importance of OATP1B1 (OATP-C/OATP2) in the clearance of drugs: analysis of genetic polymorphisms and its contribution to the whole body clearance of drugs (invited)

Hepatology Symposium (Neues aus der Hepatologie 2004), Zurich, Switzerland, 2004.10

Yuichi Sugiyama Drug Transporter Polymorphisms and Pharmacokinetics (invited)

Gordon Conference; Membrane Transport Proteins, Les Diablerets, Switzerland, 2004.10

設楽悦久、平野雅、佐藤均、杉山雄一 高脂血症治療薬セリバスタチンとゲムフィブロジルの薬物間相互作用機序の解明 (シンポジウム)

第19回日本薬物動態学会年会 金沢 2004.11

前田和哉、家入一郎、保田国伸、藤野明治、藤原博明、大坪健司、楠原洋之、杉山雄一 日本人健康人におけるプラバスタチン、テモカプリル、バルサルタンの薬物動態に与える OATP1B1(OATP-C/OATP2)*1b 遺伝子型の影響 (シンポジウム)

第19回日本薬物動態学会年会 金沢 2004.11

平野雅、前田和哉、林久允、楠原洋之、前田和哉 Non-bile acid, pravastatin, can be a substrate for bile salt export pump (BSEP)

第19回日本薬物動態学会年会 金沢 2004.11

清水真紀、布施香織、奥平和穂、西垣隆一郎、

前田和哉、楠原洋之、杉山雄一 Contribution of OATP family transporters to the hepatic uptake of fexofenadine

第19回日本薬物動態学会年会 金沢
2004.11

石黒直樹、前田和哉、Thomas Ebner, Willy Roth, 五十嵐隆、杉山雄一 Involvement of OATP families in the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist

第19回日本薬物動態学会年会 金沢
2004.11

松島総一郎、前田和哉、平野雅、近藤千尋、杉山雄一 ヒト肝臓の胆管側膜における有機アニオン系化合物の排泄に関与するトランスポーターの寄与率の検討

第26回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 東京 2004.11

Yuichi Sugiyama Assessment of Transcellular Transport of New Drug Candidates to Predict their Hepatobiliary and Renal Clearances (invited)

The 3rd Annual Drug Discovery & Development Summit, San Diego, USA, 2004.12

山城わかば、前田和哉、平野雅、杉山雄一 選択的AT1受容体ブロッカーvalsartanのヒト肝臓における取り込み・排泄に関わるトランスポーターの同定と寄与の解明

日本薬剤学会創立20周年記念大会 東京
2005.3

北村吏司、前田和哉、杉山雄一 HMG-CoA還元酵素阻害薬ロスバスタチンの肝消失に関わるトランスポーターの同定

日本薬剤学会創立20周年記念大会 東京
2005.3

G 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

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

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・副薬剤部長

研究要旨：本年度は、有機カチオントランスポーター(OCT1)およびp-糖タンパク(MDR1)を取りあげた。前者(i)については、2型糖尿病治療薬であるメトホルミン(MT)の血糖降下作用に見るノンレスポンドーとOCT1遺伝子多型との関連、後者(ii)は、MDR1遺伝子のプロモーター領域に見る遺伝子多型とヒト胎盤におけるp-糖タンパク発現量との関連について検討を加えた。(i)MTのノンレスポンドーとレスポンドーとの違いを判別関数分析で評価した結果、高齢者、肥満、高脂血症治療薬服用の有無が正の関与、OCT1遺伝子変異のV408Mの負の関与が認められた。ヒト肝に発現するOCT1 mRNA発現量とV408M変異との関連では、変異の存在で発現量の低下が認められた。(ii)プロモーター変異のハプロタイプに注目して解析した結果、haplotype 3 (C-G-GA-del-C-T-A-G-C-C) および 4 (T-A-GA-CCATC-T-T-A-A-C-T)によるmRNAおよびタンパク発現量の顕著な増加が認められた。転写因子結合領域の変異化およびメチル化の差が背景にあると考えられる。以上の検討より、肝での薬物の取り込みを規定するOCT1遺伝子、胎盤での異物排出に関与するMDR1遺伝子の多型が薬効や機能の個人差とな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

(i) OCT1遺伝子多型とメトホルミンの血糖降下作用；鳥取大学病院内科に通院するMT服用患者33名を対象とした。HbA1cの変動と医師の診察に基づき、レスポンドー(n=24)とノンレスポンドー(n=9)に層別した。患者より得たゲノムDNAを試料に、OCT1遺伝子の多型解析を行い、変異の関与を検討した。さらに、プールヒト肝組織中に発現するOCT1 mRNA発現量と変異との関連も併せて検討した。

(ii)MDR1プロモーター変異の機能解析；プロモーター領域の変異をハプロタイプで

層別し、ヒト胎盤でのp-糖タンパク発現量への関与を検討した。さらに、luciferase assay、mobility shift assay、メチル化解析により、機序を検討した。

(倫理面への配慮)；遺伝子解析に使用したDNAおよびヒト臓器は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。さらに、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

(i) OCT1遺伝子多型とメトホルミンの血糖降下作用；MTのレスポンドーとノンレスポンドーの遺伝子解析比較の結果、V408M変異の頻度がノンレスポンドー群で高かった。両群を区別する要因を明らかにする目的で、判別関数分析を行った。年齢、肥満度、合併症などの患者基礎情報 12

項目と遺伝子多型情報 5 項目を取り入れた分析を実施した。その結果、年齢(係数=0.09)、BMI (body mass index, 0.23)、高脂血症治療薬服用(2.25)が正の関与であった。すなわち、高脂血症治療薬の投与を受ける肥満のある高齢者で MT が有効であることを意味し、従来の臨床で使用経験を支持する結果と言える。遺伝子関連では、V408M 変異の負の関与が認められた。そこで、ヒト肝における OCT1 mRNA 発現量への関与を検討した結果、本変異の総菜により発現量の低下が認められた。

(ii) MDR1 プロモーター変異の機能解析; MDR1 遺伝子プロモーター領域、約 2kb の多型解析を行った。その結果、10 箇所に 2 ないし 5 塩基の欠損を含む変異を同定した。さらに、ハプロタイプ解析を行った結果、10 種類のハプロタイプを認めた。ヒト肝および胎盤に発現する MDR1mRNA 量との関連を評価した結果、haplotype 2 および 3 で有意な発現量の増加が観察された。luciferase assay、lectrophoretic mobility shift assay、メチル化解析の結果、T-1517aC、T-1017aC、T-129C が転写に重要な部位であることが明らかとなった。さらに、これらのプロモーター変異は、C3435T 変異とは独立の変異であった。

D. 考察

MT は、肥満のある 2 型糖尿病患者に繁用されるピグアナイド系インスリン抵抗性改善薬であるが、以前より、肝抵抗性を示すノンレスポonderの存在が問題視されていた。前半は MT の肝取り込みを規定する OCT 遺伝子変異の関与を想定した。後者では MDR1 遺伝子変異の重要性は認識されてい

るものの、その機能評価には一定の知見がないことから、プロモーター変異の関与を新たに着目して検討を加えた。いずれの検討でも、新たに変異の関与が示唆された。OCT1 遺伝子では、ヒト肝での mRNA 発現量の低下を伴う V408M 変異の関与が認められた。本変異の機能への影響についての研究報告は少なく、今後の追加検討が待たれる。MDR1 プロモーター変異の詳細な検討を加えた結果、10 種の haplotype を同定し、2 種類の重要性が示唆された。MDR1 遺伝子では、3435 位と 2677 位の変異が注目されており、議論されているところであるが、興味あることに、2 種類の haplotype は、これらの SNPs と独立して存在し、機能することが明らかとなった。このことから、coding 領域に加え、promoter 領域の変異の考慮も重要であることが示唆される。以上の結果より、OCT1、MDR1 遺伝子に見る多型は、それぞれが関与する医薬品の効果や体内動態の個人差の原因となると予想される。

E. 結論

OCT1 遺伝子の V408M 変異や MDR1 プロモーター変異である haplotype3, 4 は、薬物などの基質輸送能の低下や亢進を生じ、効果や体内動態にみる個人差の原因となることが示唆される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, Takane H, Nishizato Y, Irie S, Urae A, Kawabata K, Higuchi S, Otsubo K, Sugiyama Y. Influence of common variants in the pharmacokinetic genes