

基質とし、かつグルタチオン抱合体・グルクロン酸抱合体を含む広汎な有機アニオンを基質とすることも知られている。ラット MRP2 を先天的に欠損した変異ラット (TR-, Eisai Hyperbilirubinemic rat) では、多くの有機アニオンの胆汁排泄が消失していることから、胆汁酸を除く多くの有機アニオン化合物の胆汁排泄に主たる役割を果たしていることが明らかになっている<sup>12)</sup>。MRP2 については、Dubin-Johnson 症候群の患者で同定された遺伝子多型 (MRP2 の機能を欠損する変異である) のほか<sup>12)</sup>、48 人の日本人健常者について SNP の検索が行われている<sup>18)</sup>。その中でアミノ酸変異を伴うものに G1249A (12.5%, Val → Ile) が報告されているが、その変異が MRP2 機能にどのように影響を与えるのかについては不明である。

OATP-C と MRP2 の基質選択性は類似しており、両者の共通の基質となる薬物は効率的な経細胞輸送を受けることが、両トランスポーターを同時に極性細胞に発現させた共遺伝子発現系の解析により明らかにされている<sup>21)</sup>。イヌ腎臓遠位尿管由来の上皮細胞である MDCKII 細胞に両トランスポーターを発現させた場合、OATP-C は基底膜に、MRP2 は頂側膜へと局在する。その結果、共通の基質薬物の基底膜側から頂側膜側への経細胞輸送は顕著に促進されている (図 5)。OATP-C ならびに MRP2 の各種変異体の組み合わせで作成することにより、*in vivo* での肝胆系輸送がどのように変動するか予測するためのツールと成り得るものと考えられる。

#### おわりに

以上、薬物トランスポーターについての遺伝子多型について取り上げた。薬物トランスポーターについての遺伝子多型についてはまだ研究の途についたばかりであり、現在のところ genotype の解析が中心となっており、必ずしも phenotype との対応がとられていない。この点

については、各トランスポーターのアリルならびにハプロタイプの整理とともに、多型がトランスポーター機能に与える影響を検討することが必要である。さらに、genotype と phenotype との対応をとるために、生体膜透過に占めるトランスポーターの寄与率を評価する方法論を確立すること、ならびに適当なプローブドラッグを見いだすことが急務である。こうした知見を蓄積していくことで、近い将来に、テーラーメイド医療・ブリッジング試験を行うための分子基盤が確立されるものと期待している。

#### 文 献

- 1) 「次世代ゲノム創薬」日本薬学会編, 中山書店, 2003.
- 2) 「薬物動態・作用と遺伝子多型」澤田康文 編, 医薬ジャーナル社, 2001.
- 3) 「ファーマコゲノミクス」ed by Kalow W *et al*, 石川智久監訳, テクノミック.
- 4) Evans WE and Relling MV: Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286: 487, 1999.
- 5) Pelkonen O: Human CYPs: In vivo and clinical aspects. *Drug Metab Rev* 34: 37, 2002.
- 6) Bachmann KA: Genotyping and phenotyping the cytochrome P-450 enzymes. *Am J Ther* 9: 309, 2002.
- 7) Nakai D *et al*: Human liver-specific organic anion transporter, LST-1, mediates uptake of pravastatin by human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 861, 2001.
- 8) Sekine T *et al*: The multispecific organic anion transporter (OAT) family. *Pflugers Arch* 440: 337, 2000.
- 9) Hagenbuch B and Meier PJ: The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1609: 1, 2003.
- 10) Kusuvara H and Sugiyama Y: Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *J Control Release* 78: 43, 2002.
- 11) Mizuno N and Sugiyama Y: Drug transporters: their role and importance in the selection and development of new drugs. *Drug Metabol Pharmacokin* 17: 93, 2002.

- 12) Suzuki H and Sugiyama Y : Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2) : its impact on drug. *Adv Drug Deliv Rev* **54** : 1311, 2002.
- 13) Iida A *et al* : Catalog of 258 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding three organic anion transporters, three organic anion-transporting polypeptides, and three NADH : ubiquinone oxidoreductase flavoproteins. *J Hum Genet* **46** : 668, 2001.
- 14) Hoffmeyer S *et al* : Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene : multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 3473, 2000.
- 15) Fromm MF : The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev* **54** : 1295, 2002.
- 16) Tirona R *et al* : Polymorphisms in OATP-C. *J Biol Chem* **276** : 35669, 2001.
- 17) Nozawa T *et al* : Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC21A9) : allele frequencies in the Japanese population and functional analysis. *J Pharmacol Exp Ther* **302** : 804, 2002.
- 18) Ito S *et al* : Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects. *Pharmacogenetics* **11** : 175, 2001.
- 19) Leabman MK *et al* : Polymorphisms in a human kidney xenobiotic transporter, OCT2, exhibit altered function. *Pharmacogenetics* **12** : 395, 2002.
- 20) Schinkel AH : P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* **36** : 179, 1999.
- 21) Sasaki M : Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *J Biol Chem* **277** : 6497, 2002.

## 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

○前田和哉、神原美由紀、平野雅、杉山雄一

東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学教室

### 【目的】

一般的に、薬物の膜透過は、単純拡散であれば、分子量がある程度小さく、脂溶性が高いほど大きくなる傾向にあるが、一部の化合物でこの仮定に反して非常に効率よい取り込みが見られることが次第に明らかとなっており、その能動的な輸送機構の一つとして、トランスポーターの関与が挙げられる。これまでげっ歯類（ラット、マウス）における検討が先行して進められてきたが、近年、ヒトにおいても多くのトランスポーターがクローニング、機能解析が進められている。図1には、ヒト肝臓に発現が認められ、有機アニオンの輸送に関わりうるトランスポーター群を示した。特に血管側から肝細胞中への取り込みに関与するトランスポーターとしては、種々の OATP(organic anion transporting polypeptide)

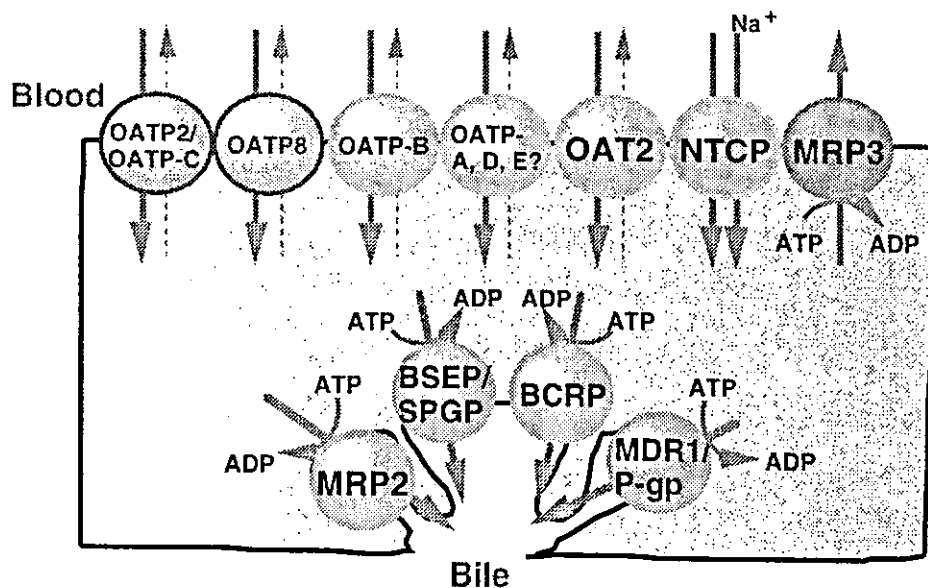


図1：ヒト肝臓において有機アニオン化合物の輸送に関与するトランスポーター群

ファミリーのトランスポーター群や、OAT2(organic anion transporter 2)、主に胆汁酸の  $\text{Na}^+$  依存的な取り込みに関与すると考えられている NTCP( $\text{Na}^+$ -taurocholate cotransporting polypeptide)などが挙げられる。中でも OATP2(OATP-C/LST-1/SLC21A6)<sup>1-3)</sup>と、OATP8(LST-2/SLC21A8)<sup>4,5)</sup>は、両者間で高いホモロジーを有し、共に肝臓に比較的特異的な局在を示す。また、これまでの報告で、非常に多様な構造にわたる化合物、とりわけ HMG-CoA 還元酵素阻害薬 pravastatin<sup>2,6)</sup>や、抗結核薬 rifampicin<sup>7,8)</sup>など多くの薬物を基質とすることから、薬物の肝指向性を決定付ける1つの重要な要因として位置付けられると考えている。両者の基質特異性は、一部は異なるものの非常にオーバーラップしており、大多数の化合物は、両方のトランスポーターによって輸送されると思われる。トランスポーターを介した薬物の肝ターゲティングを考える場合において、病態時などにおける個々のトランスポーターの発現変動や、SNPs(single nucleotide polymorphism)などに起因する機能変化などがあったときに、個々のトランスポーターを介した輸送能力の変動が、肝取り込み全体に与える影響を定量的に評価する上で、各トランスポーターの肝取り込みにおける寄与率を算定しておくことは、非常に重要な情報の一つになる。しかしながら、現時点でヒトの肝取り込み過程において各トランスポーターの寄与率を定量的に評価した研究は皆無である。そこで、我々はヒト凍結肝細胞とトランスポーター遺伝子発現系を用いて、ヒト肝取り込み過程における各トランスポーターの寄与率評価系を構築することを目的として研究を行った。

## 【方法】

### ヒト OATP2, OATP8 発現系の作製

ヒト OATP2, OATP8 cDNA 断片を哺乳類発現ベクター pcDNA3.1(Invitrogen)に挿入した。発現ベクターを HEK293 細胞に FuGENE6(ロシュダイアグノスティクス)を用いて lipofection 法にて導入し、G418 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$  共存下において2~3週間培養を続けることで、ベクター導入細胞のセレクションを行った。セレクション後は、D-MEM(low

glucose)+10% FBS+1% antibiotic/antimycotic( $\times 100$ ) liquid (Gibco BRL)にて継代・維持した。

#### ヒト OATP2, OATP8 遺伝子発現系を用いた輸送実験

取り込み実験は、常法に基づいて行った<sup>9)</sup>。輸送実験 3 日前に、poly-L-lysine と poly-L-ornithine であらかじめコーティングした 12 well plate に細胞を  $1.5 \times 10^6$  cells/well でまいた後、導入遺伝子の発現量の上昇を誘起する目的で、実験 1 日前に medium を sodium butyrate(5mM)に交換した。取り込み実験は、すべて Krebs-Henseleit buffer(118mM NaCl, 23.8mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.83mM KCl, 0.96mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.20mM MgSO<sub>4</sub>, 12.5mM HEPES, 5mM glucose, 1.53mM CaCl<sub>2</sub>)の下で行った。実験前に 37 度で pre-warm した buffer で細胞を wash 後、15 分間 pre-incubation を行った。次に、放射性および非放射性的の被験化合物を含む buffer と置換して一定時間 incubation した後、氷冷 buffer で 3 回 wash することで、取り込みを停止させた。細胞中の放射能は、実験終了後 2N NaOH にて細胞を溶解し、中和後液体シンチレーションカウンターにて測定を行い、各 well の蛋白量は、Lowry 法により測定した。

#### ヒト凍結肝細胞を用いた取り込み実験

ヒト凍結肝細胞は、in vitro technologies 社より購入したものをを用いた。実験法は過去の報告に従って行った<sup>10)</sup>。解凍後の肝細胞と薬液を含む Krebs-Henseleit buffer とを遊離状態で試験管内で 37 度で一定時間 incubation し、反応停止はあらかじめ 2N NaOH およびその上層にシリコン-ミネラルオイルを重層したチューブに buffer の一部を移して遠心することで、肝細胞だけをアルカリ層に回収した。オイル層の上部・下部をそれぞれシンチレーターにいれ攪拌後、測定を行い、buffer 中および肝細胞中の放射能を見積った。

**【結果、考察】**

## 1) OATP2, OATP8 を介した各種基質化合物の取り込み活性

過去に報告がされている基質化合物の取り込みを、当教室にて作製した OATP2, OATP8 発現 HEK293 細胞を用いて測定した。その結果、OATP ファミリーの代表的基質である Estradiol-17 $\beta$ -glucuronide (E<sub>2</sub>17 $\beta$ G)の輸送は、過去の報告どおり、OATP2, OATP8 発現細胞の両方において観察された<sup>1,3-5)</sup>。また、pravastatin や cerivastatin は、OATP2 のみならず OATP8 によっても輸送されることが示された。また、Estrone-3-sulfate (E-sul)は、OATP2 を介した輸送のみが観察され、一方、cholecystokinin octapeptide (CCK-8)は、OATP8 のみによって運ばれることが、過去の報告どおり再現され<sup>11,12)</sup>、両化合物が、OATP2, OATP8 両者を分けうる選択的基質として用いることが示唆された (図 2)。

2) OATP2, OATP8 を介した E<sub>2</sub>17 $\beta$ G の輸送に対する E-sul, CCK-8 の阻害効果の検証 (図 2)

次に、E-sul, CCK-8 が選択的基質のみならず、OATP2, OATP8 の輸送を分けうる選択的阻害剤となる可能性を検証するために、両者の基質となる E<sub>2</sub>17 $\beta$ G の取り込みに対する E-sul, CCK-8 の濃度依存的な阻害効果を観察した。その結果、E-sul は、OATP2 を介した輸送については 0.1 $\mu$ M 存在下においても、約半分まで阻害され、1 $\mu$ M 以上においては、ほぼ完全に E<sub>2</sub>17 $\beta$ G の輸送を阻害した。一方、OATP8 を介した輸送は、E-sul 10 $\mu$ M まではまったく阻害されず、100 $\mu$ M においてようやく約半分の阻害が見られた。このことから、E-sul は、1-10 $\mu$ M 程度の濃度で適用することで、OATP2, OATP8 を介した輸送を分離する阻害剤として用いることが示唆された。CCK-8 は、両トランスポーターにおいて共に 10 $\mu$ M 付近の K<sub>i</sub> 値で輸送の阻害が見られ、この値は、過去報告された OATP8 における CCK-8 の K<sub>m</sub> 値 (6.7 $\mu$ M) とほぼ同等の値であった<sup>12)</sup>。これらから、CCK-8 は、基質と阻害剤としてのトランスポーターへの相互作用が異なることが示唆され、本化合物は OATP8 選択的阻害剤として用いることはできないことが確認された (図 2)。

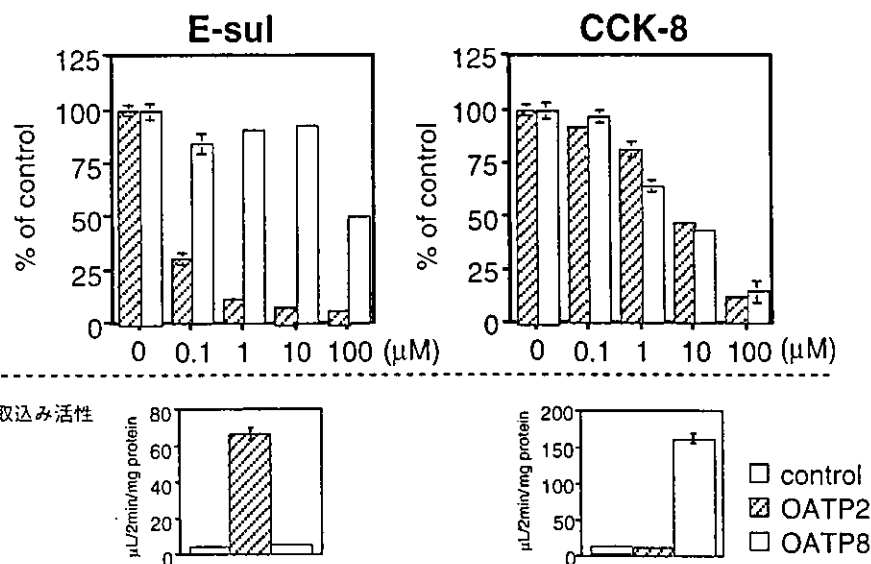
E<sub>2</sub>17βGの阻害特性

図2：OATP2, OATP8 発現系における E<sub>2</sub>17βG 取込みの E-sul, CCK-8 による阻害の濃度依存性（上段）および E-sul, CCK-8 自身の輸送能力の検討（下段）

### 3) ヒト凍結肝細胞を用いた各種化合物の取り込み

ヒト凍結肝細胞を用いて、E<sub>2</sub>17βG, E-sul, CCK-8 の取り込みを観察した。その結果、各化合物とも良好な輸送が観察され、トレーサー量の放射能の取り込みは、過剰量のリガンドによりほぼ完全に阻害されたことから、飽和性のあるトランスポーターを介した輸送が観察されていることが確認された（図3）。ヒト凍結肝細胞の活性は、ドナー自身の個人差やサンプルの保存・凍結などの条件の差に由来すると思われるサンプル間の差が大きいことが知られている<sup>10)</sup>ので、我々は、3人の独立したドナーから採取された凍結肝細胞を用いて同様の実験を行った。いずれの化合物もすべてのロットの肝細胞で有意な取り込みが観察され、その取り込み活性は、ロット間で、最大3倍程度であった。

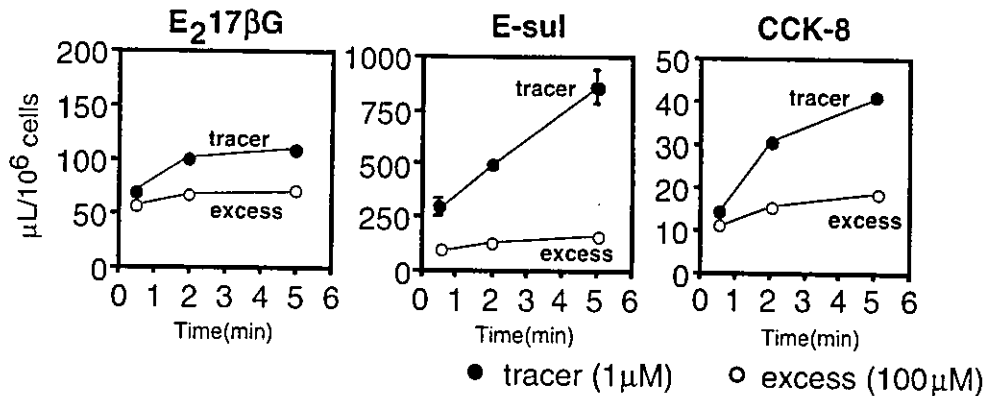


図3：ヒト肝細胞における E<sub>2</sub>17βG, E-sul, CCK-8 の時間依存的な取込みおよび、過剰量基質存在下における取込みへの影響

4) 肝細胞および遺伝子発現系への選択的基質の取り込み活性を利用した肝取り込みにおける OATP2, OATP8 の寄与率評価法の提唱

2) 3) の結果を用いて、OATP2, OATP8 両トランスポーターの取り込みにおける寄与の算定を以下のようにして行った (図4)。なお、本方法論は、RAF(relative activity factor)法として、cytochrome P450 の領域において用いられてきた方法と同一の原理を用いており<sup>13)</sup>、当教室では既に腎臓における血管側から腎細胞への取り込み過程のトランスポーターの評価に用いた例を報告している<sup>9)</sup>。

- a) 基準化合物(E-sul, CCK-8)ならびに被験化合物(ここでは E<sub>2</sub>17βG を用いる)の取り込みクリアランスを算出する。
- b) 基準化合物の発現系ならびに肝細胞における単位細胞あたりの取り込みクリアランスの比(R 値)を算出する。基準化合物が肝細胞に取り込まれる際に本当にあるトランスポーターだけを 100%介して輸送されているという仮定の下では、ここで算出された R 値は、発現系と肝細胞における発現量の比と同じであると考えられる。
- c) 上記で算出された R 値に、被験化合物の各発現系における取り込みクリアランスを乗じることで、あるトランスポーターを介しておこる肝細胞における取り込みクリアランスの絶対値が推定できる。これらをトランスポーターごとに積み上げていくことで、必



要なトランスポーターすべてが考慮されていれば、総和が肝細胞における被験化合物の取り込みクリアランスと一致するはずである。

$$CL_{\text{hep,A}} = R_{\text{OATP2}} \times CL_{\text{OATP2,A}} + R_{\text{OATP8}} \times CL_{\text{OATP8,A}} \quad (\text{Eq. 1})$$

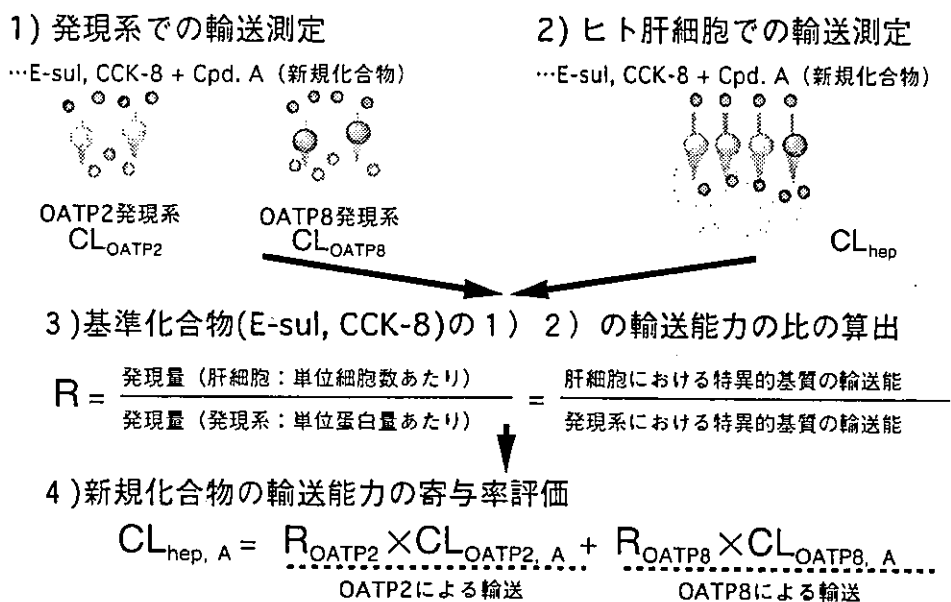


図4：ヒト肝細胞における OATP2, OATP8 の寄与率評価法

我々は、今回  $E_217\beta G$  をモデル被験化合物として、E-sul, CCK-8 の輸送能力と比較することで、OATP2, OATP8 の寄与率の評価を試みた。その結果、3) に示したロットにおいては、 $R_{\text{OATP2}}$ ,  $R_{\text{OATP8}}$  はそれぞれ、0.83, 0.29 と算出され、一方で、OATP2, OATP8 遺伝子発現系における  $E_217\beta G$  の取り込みクリアランスは、15.8, 2.31( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ )と見積もられたことから、上記 Eq. 1 より、肝細胞への取り込み過程において、OATP2, OATP8 を介したと推定されるクリアランスは、13.2, 0.67( $\mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ )と算出され、 $E_217\beta G$  の肝取り込みにおいて OATP2, OATP8 のみが輸送に関与しているとすると、それぞれの寄与は、95.1%, 4.9%と算出された。両トランスポーターを介した取り込みクリアランスの総和 13.9( $\mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ )と、実測された肝細胞における  $E_217\beta G$  の取り込みクリアランス 13.5( $\mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ )は極めて近い値を示していること、また他の2ロット

トの肝細胞において同様の実験を行った結果、いずれのロットにおいても、95%以上 OATP2 の寄与が認められ、肝細胞における取り込みクリアランスの予測値と実測値が良好にあうことから、ヒト肝臓において E<sub>2</sub>17βG の肝取り込みは、ほぼ OATP2 を考えるだけで説明がつくことが示唆される結果を得た。

#### 【総括】

今回、我々は E-sul, CCK-8 を用いることにより OATP2, OATP8 の輸送を分離して評価する方法論を提唱し、E<sub>2</sub>17βG で評価した結果、本化合物は主に OATP2 により輸送されるという結果を得た。本結果は、肝取り込み過程において OATP2, OATP8 のみを考慮しており、他に肝血管側膜上に存在する OATP-B や OAT2 など他の有機アニオン輸送系も分けて考慮する必要があると考えられる<sup>14,15)</sup>。現に E-sul は、OATP2 のみならず OATP-B によっても輸送されることが報告されている<sup>15,16)</sup>ため、今後より詳細に各トランスポーターの輸送を分離できる選択的基質の探索が望まれる。また、今回紹介したアプローチ以外にも、寄与率を評価する方法論としては、トランスポーター特異的な阻害剤を用いて、肝細胞における輸送クリアランスの減少量を評価する方法や、Western blot 法により直接トランスポーターの発現量を遺伝子発現系と肝細胞で比較する方法などもあり、最終的な結論を得るためには、このような方法を複数併用することで相互に矛盾ない結果を導くことが妥当性を示す上で重要であろうと考えており、現在検討を進めている。

#### 【Reference】

- 1) König J, Cui Y, Nies AT et al. (2000) Am. J. Physiol. 278, G156-G164
- 2) Hsiang B, Zhu Y, Wang Z et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 37161-37168
- 3) Abe T, Kakyo M, Tokui T et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 17159-17163
- 4) König J, Cui Y, Nies AT et al. (2000) J. Biol. Chem. 275, 23161-23168
- 5) Abe T, Unno M, Onogawa T et al. (2001) Gastroenterol. 120, 1689-1699
- 6) Nakai D, Nakagomi R, Furuta Y et al. (2001) J. Pharmacol. Exp. Ther. 297,

861-867

- 7) Vavricka SR, Montfoort JV, Ha HR et al. (2002) *Hepatology* 36, 164-172
- 8) Cui Y, König J and Keppler D (2001) *Mol. Pharmacol.* 60, 934-943
- 9) Hasegawa M, Kusuhara H, Endou H et al. (2003) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 1087-1097
- 10) Shitara Y, Li AP, Kato Y et al. (2003) *Drug Metab. Pharmacokin.* 18, 33-41
- 11) Cui Y, König J, Leier I et al. *J. Biol. Chem.* (2001) 276, 9626-9630
- 12) Ismair MG, Stieger B, Cattori V et al. *Gastroenterol.* (2001) 121, 1185-1190
- 13) Crespi CL (1995) *Adv. Drug Res.* 26, 179-235
- 14) Tamai I, Nezu J, Uchino H et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) 273, 251-260
- 15) Kullak-Ublick GA, Ismair MG, Stieger B et al. (2001) *Gastroenterol.* 120, 525-533
- 16) Tamai I, Nozawa T, Koshida M et al. (2001) *Pharm. Res.* 18, 1262-1269

## 12. 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—

東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学教室

平野 雅 前田 和哉 杉山 雄一

昭和大学薬学部 臨床分子薬品学教室

設楽 悦久

### Hepatic Uptake Mechanism of Pitavastatin by OATP2-and OATP8 Expressed Cells and Human Hepatocytes

Masaru Hirano<sup>1)</sup>, Kazuya Maeda<sup>1)</sup>, Yoshihisa Shitara<sup>2)</sup>  
and Yuichi Sugiyama<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo

<sup>2)</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Showa University

#### はじめに

ピタバスタチンは強力に血清コレステロールを低下させる新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬である。ピタバスタチンに代表されるように HMG-CoA 還元酵素阻害薬は薬効標的臓器である肝臓に選択的に分布することが知られており、その機序として肝取り込み過程にトランスポーターの関与が報告されている<sup>1)</sup>。ピタバスタチンにおいてもラットに標識体を投与することにより、投与 30 分後の肝臓/血漿中放射能濃度比が約 54 倍となり、他の臓器ではこのような集積が見られないことから肝臓への選択的な分布が見られている<sup>2)</sup>。

一方、ヒト肝臓における薬物の取り込みには種々のトランスポーターがかかわっていることが報告されている。血管側膜上に局在し肝取り込み過程にかかわるトランスポーターとして、主に胆汁酸を基質とする Na<sup>+</sup>依存的なトランスポーターである Na<sup>+</sup>-taurocolate co-transporting polypeptide (NTCP, SLC10A1), Na<sup>+</sup>非依存的に有機アニオン系化合物の輸送に関与すると考えられている organic anion transporting polypeptide (OATP) 2 (OATP-C/LST-1, SLC21A6), OATP8 (LST-2, SLC21A8) および OATP-B (SLC21A9), organic anion transporter 2 (SLC22A7), 有機カチオントランスポーターである organic cation transporter 1 (SLC22A1) などが知ら

れている<sup>3~5)</sup>。その中でも特に OATP2 および OATP8 はほぼ肝に特異的に発現し、他のトランスポーターと比べて非常に広範な基質認識性を有することから、肝臓における内因性基質や有機アニオン性薬物の取り込み過程において重要な役割を果たしていると考えられている。

またこれまでの報告では、OATP2 および OATP8 の基質は、かなりのオーバーラップが見られることから、多くの基質において両トランスポーターの基質であることが想定される。ある基質の肝取り込みにおける各トランスポーターの重要性を明らかにするために、両トランスポーターの肝取り込みにおける定量的な寄与率の算定は必須であると考えられるが、その方法論はこれまで詳細に検討されていない。本研究では、有機アニオン化合物であるピタバスタチンの肝取り込み過程におけるトランスポーターの関与を、特に OATP2, OATP8 に焦点を当てて明らかにし、肝取り込み全体に占める両トランスポーターを介した取り込みの寄与率を算出するために、トランスポーター発現 HEK293 細胞およびヒト凍結肝細胞を用いて輸送特性を定量的に評価した。加えて、肝細胞と発現系細胞の reference 化合物の取り込み値を比較することで寄与率を評価する方法を考案し、ピタバスタチンについて OATP2 および OATP8 の寄与率の算出を試みた。

## I 実験方法

ヒト OATP2 および OATP8 を安定発現させた HEK293 細胞およびヒト凍結肝細胞を用いて取り込み実験を行った。発現系細胞は poly-L-lysine および poly-L-ornithine コートした 12-well plate に播種し、実験 1 日前に 5 mM sodium butyrate を含む培地に交換した。取り込み実験は 37°C の Krebs-Henseleit buffer (pH7.4) 存在下で一定時間、放射標識基質を含む buffer と接触させた。その後、氷冷 buffer で 3 回細胞を洗浄した後、0.2 N NaOH を添加して細胞を可溶化し、0.4 N HCl にて中和後、標識体のカウントを液体シンチレーションカウンターにて測定した。ヒト凍結肝細胞は In Vitro Technologies より購入し、実験直前に融解して浮遊細胞として用いた。取り込み実験は 37°C の Krebs-Henseleit buffer

(pH7.4) 存在下で行い、一定時間、放射標識基質を含む buffer と試験管内にて振とうしながら接触させた。その後、細胞懸濁液を採取して比重 1.05 に調整したミネラル/シリコンオイル添加したチューブに重層して遠心分離することで薬液と細胞を分離し、細胞に取り込まれた放射能と薬液中に残存する放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

## II 結果および考察

ヒト OATP2 および OATP8 を安定発現させた HEK293 細胞およびヒト凍結肝細胞を用いて、ピタバスタチン、estradiol 17 $\beta$ -glucuronide (E<sub>2</sub> 17BG), estrone-sulfate (E-sul) および cholecystokinin octapeptide (CCK-8) の輸送特性を観察した。本発現系を用いて、ピタバスタチンは OATP2 および OATP8 の基質になることが示された。また E<sub>2</sub> 17BG は両トランスポーターの基質に、また E-sul は OATP2 の、CCK-8 は OATP8 の特異的基質になることが確認できた。凍結肝細胞 (独立した 3 人の個体から調製された異なるロット) においても上記の化合物は時間依存的に取り込まれることを観察した。

われわれは今までに特異的基質を用いる方法で寄与率を決定する方法論を提唱してきた<sup>6)</sup>。ヒト肝においても同様に適用し、OATP2 および OATP8 に対し特異的基質 (基準化合物) となる E-sul および CCK-8 を利用して、評価化合物であるピタバスタチンの発現系細胞およびヒト凍結肝細胞の取り込みクリアランスを測定することにより寄与率の算出を試みた。図 1 に示すように R<sub>act</sub> と表記した肝細胞 10<sup>6</sup> 細胞あたりの発現量と発現系細胞 mg 蛋白あたりの発現量の比は、特異的基質の輸送活性の比に等しいことから算出が可能である。またトランスポーター発現細胞から求められた評価化合物のクリアランス値に R<sub>act</sub> 値を乗じることにより、各トランスポーターを介した取り込みが算出でき、それぞれを加えることにより評価化合物の輸送活性が評価できるというコンセプトを用いて寄与率の見積もりを試みた。

表 1 にはピタバスタチンのヒト凍結肝細胞における取り込みクリアランス、ならびにトランスポーター発現細胞を用いた際の取り込みクリアランス

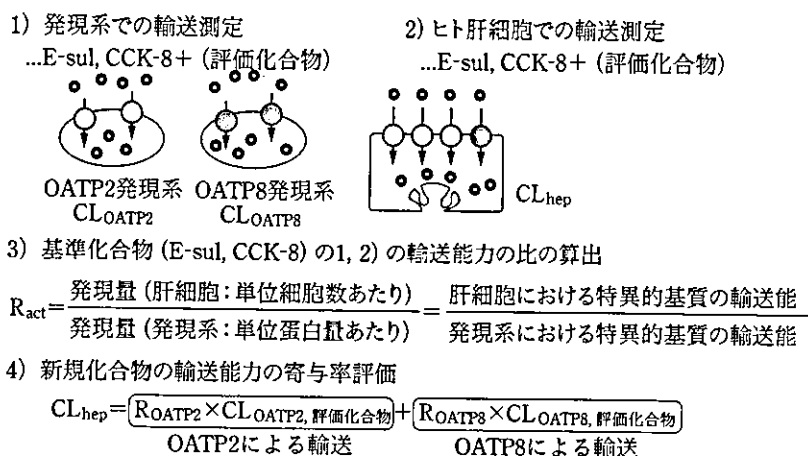


図 1 評価化合物の肝細胞の取り込みにおける OATP2, OATP8 の寄与率の算定

表 1 ピタバスタチンの肝取り込みにおける OATP2, OATP8 の寄与

基質の 取り込み クリアランス	発現系細胞 ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ )		肝細胞, $CL_{hep}$ ( $\mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ )		
	$CL_{OATP2}$	$CL_{OATP8}$	Lot. OCF	Lot. 094	Lot. ETR
E-sul	132	—	110	134	57.7
CCK-8	—	26.7	7.89	3.50	2.02
ピタバスタチン	76.6	30.6	61.3	113	39.2

ヒト肝細胞 Lot	見積もり値 ( $\mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ )	
	OATP2	OATP8
OCF	63.8 (87.7%)	8.92 (12.3%)
094	77.8 (95.1%)	4.01 (4.91%)
ETR	33.5 (93.5%)	2.32 (6.47%)

に、特異的基質の相対活性比  $R_{act}$  値を乗じた値である活性の見積もり値を示した。ピタバスタチンは OATP2 および OATP8 により取り込まれる見積もり値の和と実測の肝細胞の取り込みクリアランスに大差なく、90%程度が OATP2 による取り込みにより説明され、肝取り込み過程には OATP2 による寄与の大きいことが明らかとなった。

### おわりに

トランスポーター発現細胞およびヒト凍結肝細胞を用いて、評価化合物のトランスポーター寄与率を

算出する方法として、特異的基質の輸送活性の比より算出する方法を示した。本手法を用い、新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるピタバスタチンは主に OATP2 を介して肝特異的に効率よく取り込まれ、薬効を効果的に発現していることが示唆された。今後は肝に発現する他のトランスポーター遺伝子発現細胞、ならびにヒト肝細胞を用いた輸送・阻害実験も併せて行い、ピタバスタチンの肝取り込み過程における各トランスポーターの定量的な寄与率の評価を最終目標に、検討を進めていく予定である。

文 献

- 1) Nakai D, Nakagomi R, Furuta Y, Tokui T, Abe T, Ikeda T, Nishimura K. Human liver-specific organic anion transporter, LST-1, mediates uptake of pravastatin by human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2001 ; 297 : 861-7.
- 2) Kimata H, Fujino H, Koide T, Yamada Y, Tsunenari Y, Yonemitsu M, Yanagawa Y. Studies on the metabolic fate of NK-104, a new inhibitor of HMG-CoA reductase (1) : absorption, distribution, metabolism and excretion in rats. *Xenobio Metabol Dispos* 1998 ; 13 : 484-98.
- 3) Hagenbuch B, Meier PJ. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* 1994 ; 93 : 1326-31.
- 4) Muller M, Jansen PL. Molecular aspects of hepatobiliary transport *Am J Physiol* 1997 ; 272 : G1285-303.
- 5) Hagenbuch B, Meier PJ. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 2003 ; 10 : 1609 : 1-18.
- 6) Hasegawa M, Kusuhara H, Endou H, Sugiyama Y. Contribution of organic anion transporters to the renal uptake of anionic compounds and nucleoside derivatives in rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 ; 305 : 1087-97.

\* \* \*

## 16. 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

東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学教室

岩井 めぐみ 鈴木 洋史 杉山 雄一

九州大学大学院 薬学研究府

西里 洋平

鳥取大学医学部附属病院 薬剤部

家入 一郎 大坪 健司

### Functional Analysis of SNPs in Human OATP2 (OATP-C/SLC21A6)

Megumi Iwai<sup>1)</sup>, Hiroshi Suzuki<sup>1)</sup>, Yuichi Sugiyama<sup>1)</sup>,  
Yohei Nishizato<sup>2)</sup>, Ichiro Ieiri<sup>3)</sup> and Kenji Otsubo<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

<sup>2)</sup>Department of Clinical Pharmacokinetics, Graduate School, Kyusyu University

<sup>3)</sup>Department of Hospital Pharmacy, Faculty of Medicine, Tottori University

#### はじめに

肝臓は腎臓と並び、薬物・異物の体内からの排出に重要な役割を果たす臓器である。近年、この排出機構に関与するさまざまなトランスポーターがクローニングされ、その役割が次第に明らかとなってきた。organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2) は肝臓の血管側膜特異的に発現し、基質化合物の血中から肝臓中への取り込み過程に関与するトランスポーターである<sup>1~3)</sup>。その基質認識性は幅広く、bilirubin, 17 $\beta$  estradiol 17 $\beta$ -D-glucuronide (E<sub>2</sub>17 $\beta$ G), taurocholate, estrone-3-sulfate など生体内物質のほか、HMG-CoA 還元酵素阻害剤である pravastatin など薬物等の輸送に関わり、その血中動

態の支配要因の一つとして重要な役割を果たすことが推察される<sup>3~8)</sup>。近年、OATP2 にはさまざまな遺伝的多型が存在すること、またその多型体の *in vitro* での機能解析に関する報告がなされてきた<sup>9~11)</sup>。これら SNPs の存在により OATP2 の機能または局在に変動が生じた場合、ヒトでの基質化合物のクリアランスにも影響が現れると考えられるが、臨床での知見をもとに、それとの定量的な相関を意識した *in vitro* での OATP2 の SNPs 機能解析は現在までのところなされていなかった。

共同研究者である家入らの報告により、他の OATP2 genotype と比較して OATP2\*15 (N130D, V174A) をもつ日本人健常者において、OATP2 の基質化合物である pravastatin の腎外クリアランスに



有意に大きな減少がみられることが示された<sup>12)</sup>。同 SNPs 体は日本人における allele 頻度が 15.0% と高く、機能変動を伴うことから臨床でも重要な SNPs であることが推察される。現在までに報告された発現細胞を用いた SNPs 解析では、この OATP2\*15 の解析は報告されておらず、OATP2\*15 蛋白にどのような機能変化、あるいは局在変動が生じた結果、腎外クリアランスの低下という現象を招くのかについては不明であった。

そこで、本研究では、N130D, V174A の 2 つの SNPs が関係するハプロタイプに焦点を当て、SNPs 体蛋白でどのような変化が生じているのかを、HEK293 細胞を用いて安定発現系を構築し、日本人で高頻度に観察される OATP2\*1a (32.5%), OATP2\*1b (N130D) (45.8%) との機能比較・考察を行った。

## I 方 法

OATP2\*1a cDNA を組み込んだ哺乳類発現ベクター (pcDNA3.1 (Zeo)) を作製し、site-directed mutagenesis 法を用いて、それぞれの変異を導入することにより、OATP2\*1b (N130D), OATP2\*15 (N130D, V174A) の SNPs 体発現ベクターを構築した。これらベクターを HEK293 細胞にリポフェクション法 (FuGENE6 (Roche diagnostics corporation)) を使用) により常法に従い導入したのちに、Zeocin 200 µg/mL を含む培地でセレクションを行うことにより、各種 SNPs 体安定発現細胞を構築した。HEK293 細胞は、通常は DMEM 培地にて培養し、実験を行う 24 時間前には、培地を 5 mM sodium butyrate を含むものに交換することにより、OATP2 の発現を誘導した。

細胞内での OATP2 発現部位観察のため、免疫染色法を行った。発現細胞を実験 4 日前に poly-L-lysine コートされたスライドガラス上で培養し、-20°C のメタノールで固定、1% Triton-X100 溶液で処理したのち、常法に従い rabbit に OATP2 C 末の 21 残基のペプチド (KLH-conjugate) を皮下投与することにより作製した anti-hOATP2 polyclonal 抗体、2 次抗体として anti-rabbit IgG Alexa488 抗体を用いて OATP2 蛋白の蛍光標識を、また、核に対し

ては propidium iodide を含む封入剤を用いることにより蛍光標識を行った。観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

発現細胞における OATP2 発現量に関しては、細胞から常法に従い crude membrane を調製し、上記の anti-hOATP2 antibody を用いて Western blot 法を行い、蛋白量と band density が線形比例するような領域を選んで、band density を測定することで比較を行った。

輸送実験は、37°C の Krebs-Henseleit buffer (pH7.4) を用いて行った。一定時間、放射標識基質を含む buffer に発現細胞を接触させた後、氷冷した buffer で 2 回細胞を洗い、0.2N NaOH を入れて室温で一晩細胞を溶かした。1N HCl で中和後、その一部のカウントを、液体シンチレーションカウンターにて測定を行うことで、細胞内に取り込まれた標識体の量を見積もった。基質としては、<sup>[3H]</sup>E<sub>2</sub>17βG を用いた。また、残りの一部を用いて Lowry 法により蛋白定量を行った。OATP2 SNPs 体の単位蛋白量あたりの輸送活性は上述の Western blot 法により見積もられた相対的な発現量を基に補正を行い評価した。

## II 結果と考察

免疫染色法の結果、OATP2\*1a, OATP2\*1b (N130D), OATP2\*15 (N130D, V174A) のいずれの SNPs 体も HEK293 細胞において、細胞膜上に局在し、SNPs の導入により発現局在の変化が起こらないことが示された。また、これらの発現系から調製した crude membrane を用いて Western blot 法を行い、OATP2 蛋白の相対的な発現量を測定したところ、OATP2\*1a, OATP2\*1b 発現系では、その発現量はほぼ同等だったものの、OATP2\*15 発現系では、OATP2\*1a, OATP2\*1b と比べ、約 4 倍の発現量の上昇が観察された。本研究では、安定発現系を用いているため、OATP2 cDNA を含む発現に関与する領域がゲノムに組み込まれた位置などによりその発現量の変動することが考えられる。このため、この発現量の SNPs 体による差異は、その影響によるものであることが示唆できる。

また、<sup>[3H]</sup>E<sub>2</sub>17βG を用いて、これら発現系にお

文 献

ける OATP2 の輸送機能を見積もったところ、E<sub>2</sub>17βG に対する親和性を示す K<sub>m</sub> 値は、いずれの発現系においても、3~4 μM 程度となり、各 SNPs 体間に大きな差は認められなかった。また、最大輸送能 (V<sub>max</sub>) は、細胞上に発現している OATP2 蛋白質にも依存する値であるため、上述の Western blot 法で求めた OATP2 蛋白質の相対的な発現量で補正を行った。この結果、OATP2\*1a, OATP2\*1b 発現系の間では発現量で補正した V<sub>max</sub> の値はほぼ同等の値を示したが、OATP2\*15 発現系においては、補正 V<sub>max</sub> 値は OATP2\*1b 発現系と比べ、約 15% 程度までに低下していることが示された。

前述の家入らの報告でも、この変異を持つ日本人健康者では OATP2 基質である pravastatin の腎外クリアランスが約 20% 程度まで低下することが報告されている。したがって、われわれのこの結果は、家入らのヒト *in vivo* の結果と定量的にも矛盾しないものであると考えられる。

現在までの発現系を用いた報告では、N130D のみの SNPs を持つ OATP2\*1b において機能変化が生じないことが、複数のグループによる *in vitro* の機能解析により示されている。一方、V174A のみを持つ OATP2\*5 においては、HeLa 細胞を用いた一過性発現系で OATP2 蛋白の内在化が生じ、その結果、輸送機能の大幅な低下が生じること<sup>9)</sup>、また、HEK293 細胞一過性発現系では、OATP2\*5 が正常に膜に局在し、その最大輸送能は OATP2\*1a, OATP2\*1b に対して変化が生じない<sup>10)</sup> など、相反した報告がなされているが、V174A により何らかの機能変化が起こる可能性も示唆されている。しかしながら、本研究の OATP2\*15 のように、細胞膜上での局在には異変が見られないものの輸送機能の低下が起こるといふ結果は OATP2\*5 では現在までのところ報告されていないため、V174A と N130D という両者を併せ持ち、ハプロタイプを形成することにより初めて OATP2 蛋白あたりの輸送機能の低下が起こるといふ可能性も示唆される。そのことをより実証すべく、今後は、OATP2\*5 をも含めた機能解析を行う予定である。

- 1) Konig J, Cui Y, Nies AT, Keppler D. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000 ; 278 : G156-64.
- 2) Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, Kirchgessner TG. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 37161-8.
- 3) Abe T, Kakyō M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, et al. Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 17159-63.
- 4) Nakai D, Nakagomi R, Furuta Y, Tokui T, Abe T, Ikeda T, Nishimura K. Human liver-specific organic anion transporter, LST-1, mediates uptake of pravastatin by human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2001 ; 297 : 861-7.
- 5) Sasaki M, Suzuki H, Ito K, Abe T, Sugiyama Y. Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 6497-503.
- 6) Cui Y, Konig J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 9626-30.
- 7) Tamai I, Nozawa T, Koshida M, Nezu J, Sai Y, Tsuji A. Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C. *Pharm Res* 2001 ; 18 : 1262-9.
- 8) Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 273 : 251-60.
- 9) Tirona RG, Leake BF, Merino G, Kim RB. Polymorphisms in OATP-C : identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 35669-75.
- 10) Nozawa T, Nakajima M, Tamai I, Noda K, Nezu J, Sai Y, et al. Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC21A9) : allele frequencies in the Japanese population and functional analysis. *J Pharmacol Exp Ther* 2002 ; 302 : 804-13.

- 11) Michalski C, Cui Y, Nies AT, Nuessler AK, Neuhaus P, Zanger UM, et al. A naturally occurring mutation in the SLC21A6 gene causing impaired membrane localization of the hepatocyte uptake transporter. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 43058-63.
- 12) Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, Kawabata K, Hirota T, et al. Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes : consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2003 ; 73 : 554-65.

\* \* \*

### 3 遺伝子多型と抗がん剤の薬物動態

岩井めぐみ\*1, 前田 和哉\*2, 杉山 雄一\*3

#### Key Sentences

- ①薬効、副作用の個人差の一因として、血中・標的臓器中濃度推移などの薬物動態に関連する因子の遺伝子多型やレセプターなど薬効標的分子の遺伝子多型が考えられる。
- ②プリン代謝拮抗薬である6-メルカプトプリン(6-mercaptopurine)類の不活化に関わるTPMTのTPMT\*2(Ala 80 Pro)、TPMT\*3A(Ala 154 Thr)、TPMT\*3C(Tyr 240 Cys)などの遺伝子型においては、低TPMT活性を示す。
- ③DPDは5-フルオロウラシル(5-fluorouracil ; 5-FU)の不活化に重要な役割を担っており、DPD活性を欠く多型(DPYT\*2A)においては、重篤あるいは致死的な副作用を示した例が臨床的にも報告されている。
- ④トランスポーターの遺伝子多型が薬物動態に与える影響については、代謝酵素とくらべ未解明な部分が多いものの、近年MDR1やOATP-Cの遺伝子多型により薬物の血中濃度に変動が表れる例が報告されつつある。
- ⑤これまでは単独のSNPのみが機能変動に関与する事例研究が主体であったが、複数のSNPsを同時に持つこと、すなわちハプロタイプを考慮した解析や、複数の蛋白における遺伝子多型の影響を統合的かつ定量的に判断し、臨床での予測に直接つなげていくことが重要である。

#### Key Words

single nucleotide polymorphism (SNP), 代謝・抱合酵素, トランスポーター, ハプロタイプ

#### はじめに

一般に、等量の薬物を投与した場合においても、実際の薬効・副作用には個人差が生じることが知られている。その原因としては、年齢、生活背景といった環境要因のほか、個人の遺伝的背景の差、すなわち遺伝子多型による影響が考えられ、またその中でも、血中・標的臓器中濃度推移などの薬物動態に関連する因子の遺伝子多型と、レセプターなど薬効標的分子の遺伝子多型の2

種類に大別できる(図1)。

なかでも、新薬開発中止の原因の実に過半数が体内動態の悪さであることを考慮にいと、薬効の決定要因としての体内動態の重要性は明らかであり、その変動因子となる、酵素やトランスポーターの遺伝子多型解析の必要性が浮かび上がる。例えば遺伝子多型により蛋白の機能低下や発現量の減少が生じた場合、それが代謝・抱合酵素であれば、薬物の不活化の遅延、活性体の血中濃度の過剰な上昇による毒性発現や、プロドラッグの活性化の減少による薬効の軽減が予想でき、トランスポー

Genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes and transporters and its impact to the pharmacokinetics of anti-cancer drugs

- \* 1 Iwai Megumi : 東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室
- \* 2 MAEDA Kazuya : 東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室
- \* 3 SUGIYAMA Yuichi : 東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室教授