

Z00400281 A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

腎薬物トランスポータの遺伝子機能解析を基盤とした
高齢者の医薬品適正使用推進に関する研究
(課題番号H15-長寿-006)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 乾 賢一

分担研究者 土井 俊夫

分担研究者 深津 敦司

平成17(2005)年 3月

目次

I. 総括研究報告

| | |
|---|---|
| 腎薬物トランスポータの遺伝子機能解析を基盤とした 高齢者の医薬品適正使用推進に関する研究 | 1 |
|---|---|

II. 分担研究報告

| | |
|--|----|
| 1. 腎機能低下時における薬物トランスポータの 発現変動と遺伝子多型解析 土井 俊夫 | 9 |
| 2. 腎薬物トランスポータタンパク質の発現及び 局在変動に関する研究 深津 敦司 | 13 |

| | |
|---------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 16 |
|---------------------|----|

| | |
|-----------------|----|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 17 |
|-----------------|----|

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

腎薬物トランスポータの遺伝子機能解析を基盤とした 高齢者の医薬品適正使用推進に関する研究

| | | |
|-------|-------|----------------------|
| 主任研究者 | 乾 賢一 | 京都大学医学部附属病院教授・薬剤部長 |
| 研究協力者 | 桂 敏也 | 京都大学医学部附属病院助教授・副薬剤部長 |
| | 増田 智先 | 京都大学医学部附属病院薬剤部・講師 |
| | 寺田 智祐 | 京都大学医学部附属病院薬剤部・助手 |
| | 本橋 秀之 | 京都大学医学部附属病院薬剤部・助手 |

【研究要旨】

適切な腎機能の把握にもとづいて患者個々の薬物排泄能を予測することは、高齢者薬物療法に付随する副作用を回避するために重要である。腎薬物トランスポータの機能ならびに腎疾患患者における発現変動、薬物動態、遺伝子多型について解析し、薬物投与設計におけるこれら情報の有用性について評価した。尿細管分泌において主要な役割を担う有機アニオントランスポータ hOAT1 及び hOAT3 について検討した。腎機能検査薬パラアミノ馬尿酸は主として hOAT1 に、セフェム系抗生物質は hOAT3 に、抗癌剤メトトレキサートなどは hOAT1 と hOAT3 の両方によって輸送されるなど、両トランスポータは基質認識特性が異なることが明らかとなった。一方、クレアチニンが hOAT2 によって輸送された。クレアチニンクリアランスは糸球体濾過速度の指標として用いられるものの、尿細管分泌過程が寄与することが臨床上の問題点となっている。本研究結果から、クレアチニンの尿細管分泌には hOAT2 が関与することが示唆された。また hOAT2 によるクレアチニンの輸送はシメチジンなどのカチオン性薬物によって阻害され、カチオン性薬物投与によるクレアチニンの尿細管分泌の低下と対応するものであった。

正常腎組織と比較して腎疾患患者の腎組織では hOAT1 の発現量が顕著に減少していた。また、hOAT3 や有機カチオントランスポータ hOAT2 も減少するが、hOAT2 には有意な変化が認められず、トランスポータごとに異なった発現変動を示すと考えられた。一方、アニオン性薬物セファゾリンの消失速度定数は、クレアチニンクリアランスよりも PSP 試験値と良好な相関を示した。さらに、セファゾリンの消失速度定数とトランスポータ発現量との相関解析においては、hOAT3 のみが有意な相関を示した。従ってセファゾリンの腎排泄には、hOAT3 発現量によって規定される尿細管分泌過程が大きく寄与すると考えられた。さらに患者群をメサンギウム増殖性糸球体腎炎とその他の患者群とに分類し再解析したところ、hOAT3 発現量とセファゾリン消失速度との相関係数が上昇した。以上より、トランスポータ発現量と薬物腎排泄能との相関は、原疾患に影響を受けることが示唆された。

hOAT3 遺伝子多型について検討した。その結果、1 箇所の nonsynonymous mutation を見出した。この変異によって hOAT3 によるセファゾリン輸送は上昇したが、フェノールスルホフライン輸送は低下した。しかしこの遺伝子多型をヘテロ型で有する患者が 114 名中 3 名存在したが、この変異を有する患者群とその他の患者群とで PSP 試験値やセファゾリン消失速度に有意な差は認められなかった。

尿細管薬物トランスポータの機能および発現に関する情報は、分子的根拠に基づいた薬物排泄量の予測系ならびに至適投与設計法の確立に有用な情報であることが示唆された。

【分担研究者】

1. 土井 俊夫・徳島大学医学部・教授
2. 深津 敦司・京都大学医学部附属病院・講師

A. 研究目的

腎臓は肝臓と並び異物解毒を司る主要な臓器であるが、一般に加齢とともに腎機能は低下することが知られている。高齢者の薬物療法上の問題点として、腎機能低下に伴い薬剤性腎障害の発症頻度が著しく高くなること、またその腎不全は進行性・不可逆性である場合が多いことが挙げられる。腎機能低下時には薬剤性腎障害が進展しやすいことや、薬物の排泄遅延に起因する血中濃度上昇が種々の副作用を惹起することなどが問題をさらに深刻化させている。これら予期せぬ副作用を回避するためには、腎機能に応じた薬物投与設計と副作用発現の早期発見が必要である。しかし腎障害を惹起する薬物は多岐にわたり、想定される副作用発現機序が複雑であること、特に高齢者において薬物排泄能や副作用発現の個人差が大きいことなどが、至適投与設計や副作用回避を困難にする原因となっている。従って、患者個々の腎機能（薬物排泄能）を適切に把握し至適薬剤投与設計を行う方法を確認することが、高齢者薬物療法に付随する副作用を回避するために必要とされている。

近年、腎臓からの異物排泄に重要な役割を果たす薬物排泄タンパク質（薬物トランスポータ）群が同定され、生理的・病態生理学的役割の解明が進められている。これらのトランスポータは尿細管上皮細胞への薬物移行を媒介するため、薬物の尿中排泄という解毒機能並びに薬物の腎組織内蓄積に伴う毒性発現の両面において中心的な役割を担うと想定される。本研究では薬物トランスポータの変動が薬物腎排泄能を規定する要因であると想定し、トランスポータの機能および発現変動を考慮した至適薬剤投与設計法の確立を目指す。高齢者個々における薬物腎排泄能並びに副作用発現の個体差を規定する重要因子を解明し、個別薬剤投与設計へ応用するための方法論確立を目標とする。本研究目標の実現によって個別化投与設計法が臨床応用されれば、薬剤性腎障害などの副作用が低減し、高齢者の健康増進に貢献

する。また至適投与計画によってもたらされる使用薬剤の適正化や副作用発現の低減は、医療費削減につながることを期待される。

B. 研究方法

本年度は2年計画（平成15年度～平成16年度）の最終年度に当たり、(1) 薬物トランスポータの機能特性の差別化 (2) 薬物トランスポータ発現量予測因子の探索 (3) 薬物トランスポータ遺伝子多型解析を行い、臨床応用に向けた研究を展開した。

1) 薬物トランスポータの機能解析

ヒト腎組織には多様な薬物トランスポータ群が発現していることから、トランスポータを考慮した薬物投与設計のためには機能の差を明確にする必要がある。従って薬物トランスポータ遺伝子を導入した培養細胞系を用いて輸送機能の特性について検討した。

2) 腎疾患患者における薬物トランスポータ発現量の測定

腎機能検査値の異常から腎疾患が疑われ、確定診断を目的として、腎生検組織検査が施行された患者114名を対象とした。余剰腎生検組織から、total RNAを精製し、リアルタイムPCR法によって組織中のトランスポータ発現量を定量した。また、腎生検施行後に感染症予防を目的として投与されるセファゾリン及び腎機能検査薬であるPSPの尿中排泄速度、内因性のカチオン性物質であるN-methyl nicotinamide (NMN)の尿中排泄速度について検討した。

3) 薬物トランスポータ遺伝子多型の解析

薬物トランスポータの遺伝子多型について腎薬物トランスポータ中で最も発現量の高いhOAT3について遺伝子解析を行った。各患者のゲノムDNAは血液検体から精製した。hOAT3遺伝子については新規遺伝子多型の可能性を想定し、全exonの塩基配列を決定した。また、既知遺伝子多型については、ポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長多型(PCR-RFLP)法によって解析した。さらに、アミノ酸変異を伴う遺伝子変異のトランスポータ輸送活性に及ぼす影響については変異を導入したトランスポータDNAを作成し、培養細胞を用いたin vitro発現系を用いて解析した。

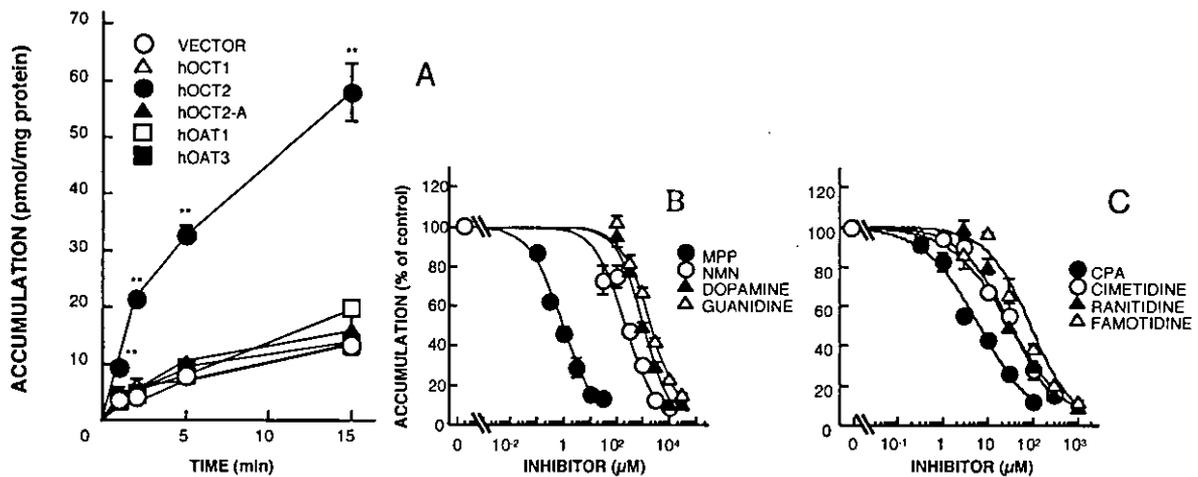


Fig. 1 hOCT2によるクレアチニン輸送(A)及びカチオン性薬物による阻害効果(B)

(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を優先する。すなわち、1)自由意思による同意が得られた場合のみ実施対象とすること、2)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ないこと、3)血液や組織由来の核酸が他の目的に使用されないこと、4)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、5)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、6)実施対象者の個人識別情報は連結可能匿名化方式で厳重に管理・保護されること、を遵守する。本研究では、腎薬物トランスポータ遺伝子の解析結果と薬物動態・薬物毒性の解析結果との比較解析を行うため、連結可能匿名化方式での管理・保護が必要と考えられる。腎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。また摘出腎組織試料は、本研究のために採取するものではなく、腎腫瘍等の外科的治療により摘出した組織の一部を使用するものである。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する。本研究計画の実施(血液及び腎生検試料の一部を用いた薬物トランスポータ遺伝子の発現並びに遺伝子多型・変異解析)にあたり、「腎に発現する薬物輸送体の発現量定量と遺伝子解析に関する臨床研究」という題目で京都大学医学研究科・医学部医の倫理委員会より平成12年8月23日に指針書が交付されている。さらに平成13年3月29日の「ヒ

トゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、実施期間を遡って再度承認申請し、平成14年11月20日付けで承認書が交付されている。摘出腎組織を用いた薬物トランスポータ遺伝子の発現並びに多型・変異解析については、「腎機能不全に関わる尿細管解毒システムの遺伝子解析に関する臨床研究」の題目で京都大学医学研究科・医の倫理委員会より平成13年3月28日に承認書が交付されている。また、腎障害性薬物の腎組織移行に関する解析は「ヒト組織を用いた薬剤性臓器障害発現機序の解明と薬剤毒性スクリーニング法開発に関する研究」として平成14年8月20日に承認書が交付されている。

C. 研究成果

1) 薬物トランスポータの機能解析

・有機アニオントランスポータの機能解析

前年度においてすでに構築した有機アニオントランスポータ安定発現細胞を用いて、hOAT1及びhOAT3機能の差別化を行った。8種のセフェム系抗生物質について検討したところ全てがhOAT1及びhOAT3を阻害した。しかし、輸送活性については、すべての基質で顕著にhOAT3による輸送が大きく、hOAT1とhOAT3とで基質認識特性が異なることが示された。しかし、全てのアニオン性基質がhOAT3によって輸送されるのではなく、メトトレキサートなどは両トランスポータに同程度輸送され、一方腎機能検査薬パラアミノ馬尿酸などは主としてhOAT1に輸送された。

・有機カチオントランスポータの機能解析

クレアチニンは主に糸球体濾過によって尿中へ排泄されるため、血清クレアチニンやクレアチニク

リアランスが腎機能の指標として広く用いられている。しかし一部尿細管分泌されるため、真の糸球体濾過速度とは差があることが指摘されてきた。本研究ではクレアチニンの尿細管分泌を司るトランスポータとして有機イオントランスポータ群に着目した。クレアチニンは hOCT1 には輸送されず、hOCT2 によってのみ輸送された(Fig. 1A)。また有機アニオン輸送体 hOAT1 や hOAT3 などによっても輸送されなかった。さらに hOCT2 によるクレアチニン輸送はカチオン性薬物によって濃度依存的に阻害された(Fig. 1B and C)。各薬物の IC_{50} 値は、临床上想定されるシメチジンやプロカインアミドの血中濃度よりも低く、これらの薬物によって hOCT2 を介したクレアチニン輸送が阻害されることが示唆された。

2) ヒト腎組織における薬物トランスポータの発現変動

腎疾患患者より病理診断目的で採取した余剰腎生検組織を用いて RNA を精製し、薬物トランスポータ群の mRNA 発現量を調べた(Fig. 2)。今回、解析可能であった薬物トランスポータ (OAT1-4, URAT1, OCT2,3, OCTN1,2, PEPT1,2, MRP2,4, BCRP) について、腎癌患者の摘出腎の正常組織と比較した結果、腎生検組織では正常組織に比べて、OAT1, MRP2 と PEPT1 の mRNA 発現量が 1/10 以下にまで顕著に低下していた。また、PEPT2 が 1/8 程度、OAT3, URAT1, OCT2 及び OCTN2 mRNA の発現量は 1/2 - 1/3 程度の減少であった。一方、OAT2 及び OAT4 mRNA の発現量には、両群間で有意な変動は認められなかった。

セファゾリン排泄速度とトランスポータ発現量に

ついては、今年度新たな症例を追加しても有意な相関は変わらず、相関係数は 0.54 であった。本年度はこの相関に影響を及ぼす因子について探索した。腎疾患は各疾患によって多様な病態を示すことから、各疾患において発現変動メカニズムが異なる可能性が考えられる。そこで疾患による分類をおこなった。メサンギウム増殖性糸球体腎炎患者を抽出し解析したところ、hOAT3 発現量とセファゾリンの消失速度との相関係数は顕著に改善された。

有機カチオントランスポータによって輸送されることが明らかにされた NMN の尿中排泄速度について検討したが、hOCT2 をはじめ有機カチオントランスポータ群の発現量との間に有意な相関は認められなかった。

3) 薬物トランスポータの遺伝子多型解析

hOAT3 遺伝子多型について直接シーケンス法並びに PCR-RFLP 法を併用して解析した。その結果、1 箇所の nonsynonymous mutation を見出した。これは核酸配列 913 位のアデニンがチミンに変異しているものであり、アミノ酸配列では 305 位のイソロイシンがフェニルアラニンに置換するものである(I305F)。I305F 変異体の機能について解析したところ野生型と比較して PSP 取り込みが低下し、一方セファゾリン取り込みは上昇した(Fig. 3)。従って、この一塩基変異によってトランスポータ機能の変動することが示された。この変異について全患者を対象として頻度解析を行ったところ、発現頻度は 4.5%であり、変異を有する患者はすべてヘテロ型であった。対象として腎腫瘍患者について検討したが allele frequency は 2.1%であり変異をホモ

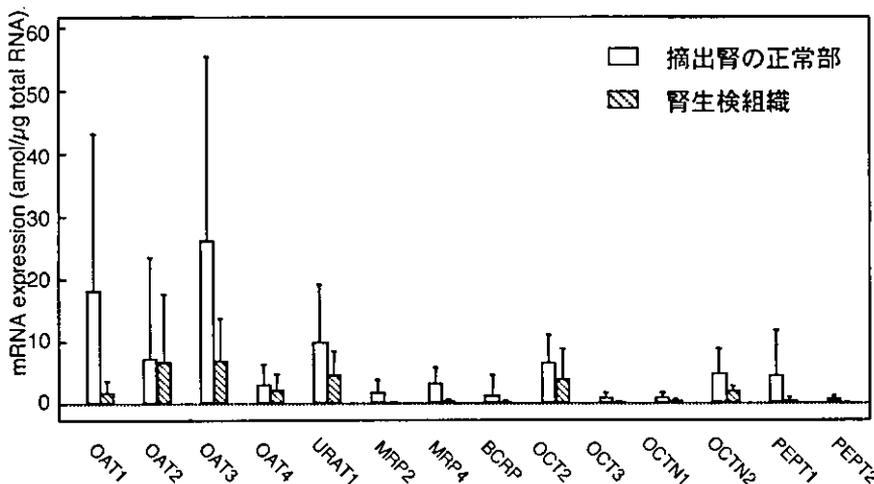


Fig. 2 腎疾患患者における薬物トランスポータの発現変動

で有する患者は見出されなかった。NCBI では発現頻度が 0.9%とされている。従って A913T 変異は他の人種と比較して日本人において高頻度に存在することが示唆された。しかしこの変異を有する患者群とその他の患者群とで PSP 試験値やセファゾリン消失速度に有意な差は認められなかった。また他の nonsynonymous mutation は見出されなかった。

4) トランスポータ発現量予測因子の探索

前年度までの研究成果により腎薬物トランスポータ発現量が薬物動態規定因子となることが示唆された。しかし hOAT や hOCT など主要な薬物トランスポータは近位尿細管に発現する。従って尿細管障害の影響を受けることが想定される。尿細管傷害と対応すると考えられている尿蛋白量、N-アセチルグルコサミド量、 β 2ミクログロブリン量などについて検討した。しかしこれらの検査値とトランスポータ発現量、セファゾリン消失速度、NMN クリアランスとの間に有意な相関は認められなかった。一方、肝臓型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)は尿細管障害とともに尿中に分泌される量が増加するが、上記の尿中検査値と比較して早期に尿中に検出されるなどの特徴がある。京大病院で腎生検が施行された 28 名の腎疾患患者について検討したところ、0.5 μ g から 80 μ g まで 160 倍の差が認められた。各腎機能検査値との比較では、尿タンパク量や、N-アセチルグルコサミド量と弱い相関が認められた。しかし、PSP 試験値やセファゾリンの消失速度、NMN クリアランスとの間には有意な相関は認められなかった。またトランスポータ発現量とも有意な相関が認められなかった。

D. 考察

前年度までの研究成果をふまえ、臨床薬物動態予測に耐えうる影響因子の探索を行った。その結果、疾患ごとの分類によってトランスポータ発現量と薬物腎排泄速度との相関が改善されることが示唆された。メサングウム増殖性糸球体腎炎は一次性糸球体腎炎で最も患者数の多い疾患であり、透析導入患者の内訳では糖尿病性腎症について第2位である。こ

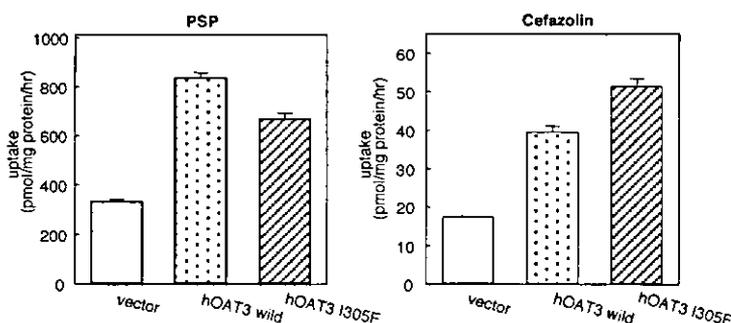


Fig. 3 hOAT3 変異体による PSP 及びセファゾリン輸送

これらの患者群でトランスポータ発現量の有用性が認められたことは、臨床応用を考える上で大きな意義を持つ。一方、相関からの外れ値と見なされる患者はループス腎炎や糖尿病性腎症であり、これら患者群での薬物動態について精査が必要である。特に糖尿病性腎症は透析導入患者の1位を占め、最も患者数の多い腎疾患の一つである。

これまで糸球体濾過速度のマーカーとして考えられてきたクレアチニンクリアランスは、hOCT2 によって輸送されることが判明し、トランスポータの機能変動に影響を受けることが予測された。一方、尿細管分泌を受けるカチオン性基質 NMN の尿中排泄クリアランスは、必ずしも hOCT2 発現量と良好な相関が認められていない。NMN はクレアチニンよりも尿中排泄クリアランスが高く、カチオン排泄能の影響が大きいと考えられる。クレアチニンクリアランスと NMN クリアランスとの差が患者ごとに異なっており、尿細管カチオン分泌能に大きな個人差が存在することを示唆している。hOCT2 発現量と NMN クリアランスが相関しない理由としては、疾患の影響や尿細管刷子縁膜における輸送の影響などが考えられる。従って尿細管刷子縁膜のカチオン輸送体の同定が必要である。一方、アニオン性薬物については、トランスポータ発現量の寄与と同時に疾患分類が必要であることが示唆された。これまで腎機能低下時の薬物投与設計において、原疾患による分類はほとんど考察されてこなかった。しかし、疾患腎における組織障害や膜タンパクの発現変動は原疾患によって異なる可能性が考えられる。

本研究ではこれまで差別化がなされていなかった hOAT1 と hOAT3 の基質認識特性の差について検討した。両者は重要な腎薬物トランスポータであるが、薬物による阻害については類似点が多く明確な差別化は未だ行われていない。本研究ではセフェム系抗生物質がすべて hOAT3 によって輸送されることが示されるなど、両者の輸送特性の違いを明らかにした。また両トランスポータの腎疾患時における発現挙動が異なるため、いずれの輸送体に認識されるかで腎排泄能の変動が異なることが予測される。

薬物トランスポータは主に近位尿細管に発現するため、尿細管障害に起因して低下することが予測される。しかし尿細管障害の指標として考えられて

いる尿中蛋白量、尿中 NAG 活性、 β 2-ミクログロブリン量などとトランスポータ発現量との間に相関は認められなかった。この結果は、トランスポータ発現変動が単に尿細管傷害にともなって低下するだけではなく、他の影響を考慮する必要性を示している。一方、疾患分類によって相関係数が上昇することなどからも、腎薬物排泄能を厳密に評価するためには単一の指標に依存するのではなく、腎機能に影響を及ぼす因子について多角的に評価する方法論を確立すべきである。これまでのクレアチニンクリアランスに依存してきた薬物投与設計において、トランスポータ情報も有用であることを示したことは、新たな投与設計の可能性を提示できたと考えられる。

E. 結論

メサンギウム増殖性糸球体腎炎患者では、hOAT3 発現量が良好な腎薬物排泄能の予測因子となる。薬物腎排泄はトランスポータ発現量によって規定されるが、精度の高い予測系構築には原疾患などの要因を加味する必要があることが示唆された。

F 健康危険情報

得られた成果の中に健康被害情報に該当するものはない。

G 研究成果発表

1. 論文発表

1) Sakurai, Y., Motohashi, H., Ueo, H., Masuda, S., Saito, H., Okuda, M., Mori, N., Matsuura, M., Doi, T., Fukatsu, A., Ogawa, O. and Inui, K.: Expression levels of renal organic anion transporters (OATs) and their correlation with anionic drug excretion in patients with renal diseases. *Pharm. Res.*, **21**(1), 61-67 (2004)

2) Yamaguchi, H., Yano, I., Saito, H. and Inui, K.: Effect of cisplatin-induced acute renal failure on bioavailability and intestinal secretion of quinolone antibacterial drugs in rats. *Pharm. Res.*, **21**(2), 330-338 (2004)

3) 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. *J. Hum. Genet.*, **49**(1), 40-45 (2004)

4) Terada, T., Irie, M., Okuda, M. and Inui, K.: Genetic variant Arg57His in human H⁺/peptide cotransporter 2 causes a complete loss of transport function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316**(2), 416-420 (2004)

5) Nakamura, N., Masuda, S., Takahashi, K., Saito, H., Okuda, M. and Inui, K.: Decreased expression of glucose and peptide transporters in rat remnant kidney. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **19**(2), 41-47 (2004)

6) Mikkaichi, T., Suzuki, T., Onogawa, T., Tanemoto, M., Mizutamari, H., Okada, M., Chaki, T., Masuda, S., Tokui, T., Eto, N., Abe, M., Satoh, F., Unno, M., Hishinuma, T., Inui, K., Ito, S., Goto, J. and Abe, T.: Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**(10), 3569-3574 (2004)

7) Masuda, S., Uemoto, S., Goto, M., Fujimoto, Y., Tanaka, K. and Inui, K.: Tacrolimus therapy according to mucosal MDR1 levels in small bowel transplant recipients. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **75**(4), 352-361 (2004)

8) Takahashi, K., Motohashi, H., Yonezawa, A., Okuda, M., Ito, N., Yamamoto, S., Ogawa, O. and Inui, K.: Elevated tacrolimus blood concentration by lansoprazole in a transplant recipient. *Ann. Pharmacother.*, **38**(5), 791-794 (2004)

9) Ashida, K., Katsura, T., Saito, H. and Inui, K.: Decreased activity and expression of intestinal oligopeptide transporter PEPT1 in rats with hyperthyroidism in vivo. *Pharm. Res.*, **21**(6), 975-981 (2004)

10) Urakami, Y., Kimura, N., Okuda, M. and Inui, K.: Creatinine transport by basolateral organic cation transporter hOCT2 in the human kidney. *Pharm. Res.*, **21**(6), 982-987 (2004)

11) Onoue, M., Terada, T., Okuda, M., Fujimoto, K., Doi, R., Imamura, M. and Inui, K.: Surgical resection deteriorates gemcitabine-induced leucopenia in pancreatic cancer. *Int. J. Clin. Oncol.*, **9**(3), 174-178 (2004)

12) Horiba, N., Masuda, S., Takeuchi, A., Saito, H., Okuda, M. and Inui, K.: Gene expression variance based on random sequencing in rat

remnant kidney. *Kidney Int.*, **66**(1), 29-45 (2004)

13) Goto, M., Masuda, S., Kiuchi, T., Ogura, Y., Oike, F., Okuda, M., Tanaka, K. and Inui, K.: CYP3A5*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics*, **14**(7), 471-478 (2004)

14) Pan, X., Terada, T., Okuda, M. and Inui, K.: Regulation of diurnal rhythm of intestinal transporters SGLT1 and PEPT1 in food deprived, refed and scheduled fed rats. *J. Nutr.*, **134**(9), 2211-2215 (2004)

15) Motohashi, H., Uwai, Y., Hiramoto, K., Okuda, M. and Inui, K.: Different transport properties between famotidine and cimetidine by human renal organic ion transporters (SLC22A). *Eur. J. Pharmacol.*, **503**(1-3), 25-30 (2004)

16) Uwai, Y., Taniguchi, R., Motohashi, H., Saito, H., Okuda, M. and Inui, K.: Methotrexate-loxoprofen interaction: involvement of human organic anion transporters hOAT1 and hOAT3. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **19**(5), 369-374 (2004)

17) Irie, M., Terada, T., Okuda, M. and Inui, K.: Efflux properties of basolateral peptide transporter in human intestinal cell line Caco-2. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.*, **449**(2), 186-194 (2004)

18) Fukudo, M., Yano, I., Masuda, S., Okuda, M. and Inui, K.: Distinct inhibitory effects of tacrolimus and cyclosporin A on calcineurin phosphatase activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **316** (2), 816-825 (2005)

19) Jiko, M., Yano, I., Okuda, M. and Inui, K.: Altered pharmacokinetics of paclitaxel in experimental hepatic or renal failure. *Pharm. Res.*, **22**(2), 228-234 (2005)

20) Kimura, N. Okuda, M. and Inui, K.: Metformin Transport by Renal Basolateral Organic Cation Transporter hOCT2. *Pharm. Res.*, **22**(2), 255-259 (2005)

21) Omae, T., Goto, M., Shimomura, M., Masuda, S., Saito, H. and Inui, K.: Transient up-regulation of P-glycoprotein reduces tacrolimus absorption after ischemia-reperfusion injury in rat ileum.

Biochem. Pharmacol., **69**(4), 561-568 (2005).

22) Shimizu, Y., Masuda, S., Nishihara, K., Ji, L., Okuda, M. and Inui, K.: Increased protein level of PEPT1 intestinal H⁺/peptide cotransporter up-regulates absorption of glycylsarcosine and ceftibuten in 5/6 nephrectomized rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **288**(4) G664-G670 (2005).

23) Habu, Y., Yano, I., Okuda, M., Fukatsu, A. and Inui, K.: Restored expression and activity of organic ion transporters rOAT1, rOAT3 and rOCT2 after hyperuricemia in the rat kidney. *Biochem. Pharmacol.*, **69**(6), 993-999 (2005).

24) Inoue, M., Terada, T., Okuda, M. and Inui, K.: Regulation of human peptide transporter 1 (PEPT1) in gastric cancer cells by anticancer drugs. *Cancer Lett.*, in press.

2. 学会発表

1) Inui, K.: Regulation Peptide Transporters in the Intestine and Kidney. Experimental Biology 2004 (April 2004, U.S.A.)

2) Katsura, T., Nishimuta, A., Okuda, M., Inui, K.: Role of PDZ-interacting domain in the plasma membrane localization of peptide transporters in stable transfected LLC-PK1 cells. Pharmaceutical Science World Congress 2004 (June 2004, Japan)

3) Okuda, M., Urakami, U., Kimura, N., Inui, K.: Human organic cation transporter hOCT2 mediates basolateral membrane transport of creatinine in the kidney. Pharmaceutical Science World Congress 2004 (June 2004, Japan)

4) Asaka J., Okuda, M., Inui, K.: Enhanced transcription of rat organic cation transporter 2 (rOCT2) gene by testosterone. Pharmaceutical Science World Congress 2004 (June 2004, Japan)

5) Asaka, J., Okuda, M., Inui, K.: Androgen receptor-mediated activation of rat organic cation transporter2 (rOCT2) promoter by testosterone. ASN renal week 2004 (October 2004, U.S.A.)

6) Masuda, S., Horiba, N., Onishi, C., Uesugi, M., Okuda, M., Inui, K.: Decreased expression of NaGLT1 protein and glucose/fructose reabsorption in rat remnant kidney. ASN renal week 2004 (October 2004, U.S.A.)

7) Okuda, M., Urakami, Y., Kimura, N., Inui, K.:
Organic cation transporter2 (hOCT2) mediates
tubular secretion of creatinine in the human
kidney. ASN renal week 2004 (October 2004,
U.S.A.)

8) Katsura, T., Nishimuta, A., Okuda, M., Inui K.,
Effect of PDZ-interacting domain deletion of the
plasma membrane localization of peptide
transporters in stably transfected LLC-PK1 cells.
ASN renal week 2004 (October 2004, U.S.A.)

9) Inui, K., Drug transporters and their
application to personalized medicine. The Keio
university international symposium for life
sciences and medicine. (January 2005, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

グルコース及び/又はフルクトーストランスポータ
NaGLT1 及びその遺伝子 (PCT/JP03/15418)
(国際特許) 平成15年12月2日出願

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

腎機能低下時における薬物トランスポータの発現変動と遺伝子多型解析

分担研究者 土井 俊夫 徳島大学医学部臨床検査医学講座教授

【研究要旨】

腎機能低下患者における薬物排泄機能と薬物トランスポータ発現量、遺伝子多型について相関解析を行った。得られた情報をもとに薬物投与設計におけるトランスポータ発現量情報の有用性について検討した。本年度は解析症例数が計 114 例となった。前年度までに得られた結果と同様に正常組織と比較して hOAT1 発現量が低下する一方で、hOAT2 などは有意な変動が認められないなど腎障害時に各トランスポータが異なった発現変動を示すことが示された。また hOAT3 発現量と抗生物質セファゾリン消失速度との相関係数も 0.54 であり前年度までと同程度であった。本年度はこれらの相関に影響を及ぼす因子を探索し、さらに精度の高い予測系構築を目指した。その結果、患者群を疾患ごとに分類することで相関係数の改善が認められた。すなわち、メサングウム増殖性糸球体腎炎の患者群のみで解析を行うことによって hOAT3 発現量とセファゾリン消失速度との間に高い相関を認めた。従って、疾患分類によって薬物消失速度の予測精度が向上することが示唆された。これらの研究成果は、トランスポータ発現量を考慮した至適薬剤投与設計法の基盤確立に有用な情報を提供する。

A. 研究目的

腎疾患患者における薬物体内動態と腎薬物トランスポータ発現量および遺伝子多型との関連について明らかにすることを目的とする。腎生検試料を用いて薬物トランスポータ発現量を定量するとともに、薬物体内動態との相関解析を行う。

B. 研究方法

組織学的診断のため採取された腎生検試料の余剰サンプルを用い、各薬物トランスポータ群の発現量をリアルタイム PCR 法で測定した。また、腎生検が施行された患者における抗生物質セファゾリンの体内動態を解析し、腎機能検査値並びに薬物トランスポータ発現量との相関について検討した。また、トランスポータ遺伝子の一塩基多型について直接シーケンシング法及び PCR-RFLP 法を用いて検討した。

（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を優先

する。すなわち、1)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、2)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、3)血液や組織由来の核酸が他の目的に使用されないこと、4)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、5)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、6)実施対象者の個人識別情報は連結可能匿名化方式で厳重に管理・保護されること、を遵守する。本研究では、腎薬物トランスポータ遺伝子の解析結果と薬物動態・薬物毒性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、連結可能匿名化方式での管理・保護が必要と考えられる。腎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。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する。なお、本研究計画の

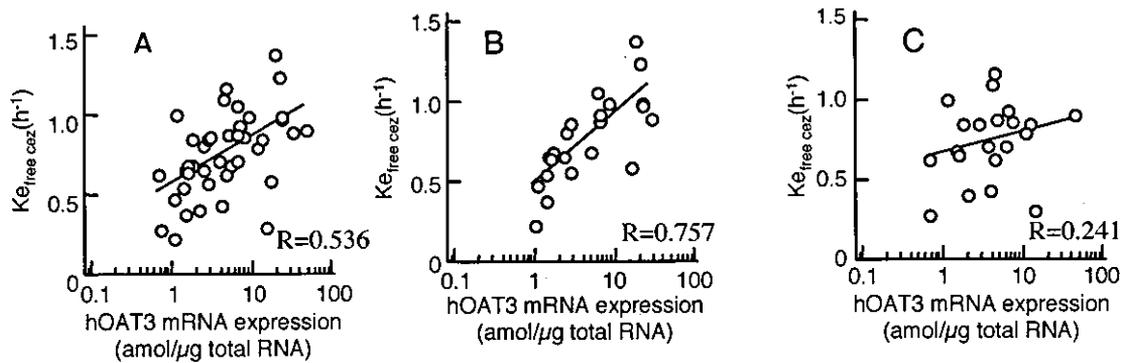


Fig.1 hOAT3 mRNA 量とセファゾリン消失速度との相関
(A:全患者群 B:メサンギウム増殖性糸球体腎炎 C:メサンギウム増殖性糸球体腎炎以外)

実施（血液及び腎生検試料の一部を用いた薬物トランスポート遺伝子の発現並びに遺伝多型・変異解析）にあたり、「腎に発現する薬物輸送体の発現量定量と遺伝子解析に関する臨床研究」という題目で徳島大学医学部附属病院病院倫理小委員会より平成12年8月29日付けで承認を受けた。

C. 研究成果

1) 薬物トランスポート発現変動と薬物腎排泄

腎機能低下により各種腎疾患が疑われ、病理診断目的で腎生検が施行された患者の余剰組織検体を用いて薬物トランスポート mRNA 発現量を検討した。最終的に 114 症例について解析を行った。その結果、hOAT1 などが顕著に低下するものの hOAT2 などには有意差が認められず、トランスポートごとに異なった発現変動を示すことが示唆された。

腎生検施行後、感染症予防を目的として投与される抗生剤セファゾリンの体内動態について検討した。定速静注直後と投与 1 時間後に採血を行い、血中濃度を測定し体内消失速度を算出した。セファゾリンはほぼすべてが未変化体として尿中に排泄されるため、体内消失速度は腎臓からの排出変動を反映していると考えられる。セファゾリンの消失速度定数と PSP 試験値とが高い相関を示すが、セファゾリンと PSP がともに hOAT3 に輸送されることは既に確認済みである。腎疾患患者におけるセファゾリンの消失速度とトランスポート発現量との比較解析を行った結果、セファゾリン消失速度と hOAT3 発現量との間に有意な相関が認められた。しかしながら hOAT1、hOAT2 及び hOAT4 など、他の有機アニオントランスポート発現量との間には相関が認められなかった。

症例を増やしても前年度までと同様に hOAT3 発現量がセファゾリン消失速度と相関する結果が得ら

れた。しかし相関係数は高くなく ($r=0.54$)、投与設計の基礎情報として用いるためには、さらに高い相関関係を見出す必要がある。本年度は hOAT3 に加えて評価すべきパラメータの探索を行った。年齢、性別、肝機能などをパラメータとして組み入れ重解析などを行ったが、顕著な相関係数の改善は認められなかった。そこで疾患ごとの分類を行った。114 症例のうち、メサンギウム増殖性糸球体腎炎患者が最も多かった。メサンギウム増殖性糸球体腎炎の患者群では、その他の疾患群と比較してセファゾリン消失速度定数、クレアチニンクリアランス、有機イオントランスポート発現量、セファゾリンの消失速度とクレアチニンクリアランスや PSP 試験値との相関係数に差は認められなかった。一方、hOAT3 発現量とセファゾリン消失速度定数、PSP 試験値との相関係数は全患者群で解析した場合と比較して顕著に高い値を示した(Fig. 1)。

2) 腎疾患患者における遺伝子多型解析

メサンギウム増殖性糸球体腎炎患者群においてセファゾリン消失速度と hOAT3 mRNA 量との間に高い相関が認められたことは、すなわちそれ以外に相関から逸脱する患者が存在することを示唆している。そこでセファゾリン消失速度と hOAT3 mRNA 発現量との相関について残差解析を行い、最も残差の大きい 5 名の患者を外れ値と見なした。これら 5 名を外れ値と仮定することで相関係数は 0.53 から 0.69 に上昇した。これらの患者に対して、hOAT3 遺伝子多型の可能性について検討を行った。その結果 nonsynonymous 変異が 1 箇所見出された。この変異は hOAT3 輸送活性に影響を及ぼすことが乾らによって明らかとされた。PCR-RFLP 法によって、全ての患者について検証したところ、変異をヘテロで有する患者は 3 名であった。しかし、変異を有する患者と、その他の患者との間に PSP 試験値や

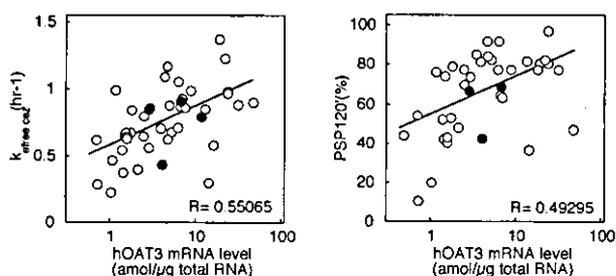


Fig.2 hOAT3 mRNA 量とセファゾリン消失速度及び PSP 検査値との相関 (closed circle は I305F を有する患者)

セファゾリン消失速度に有意な差は認められなかった。また、変異を有する患者群を除外値と仮定しても、hOAT3 mRNA 量とセファゾリン消失速度との相関係数に差は認められず(Fig. 2)、この変異は hOAT3 を介した薬物腎排泄能に影響を及ぼさないと考えられた。

D. 考察

本研究では、正常部において高い発現の認められた有機イオントランスポータ群について、腎生検組織中の発現量を測定した。その結果、腎疾患時において、各薬物トランスポータが異なった発現変動を示すことが示唆された。このことから、個々の薬物が何れのトランスポータによって尿細管分泌されているかによって、疾患時における体内動態が異なる可能性が考えられる。また、腎薬物トランスポータ発現量と薬物排泄能との相関をヒトにおいて見出した。hOAT3 がセファゾリンを輸送すること、hOAT3 発現量がセファゾリンの体内消失速度と高い相関を示すことから、セファゾリンの尿細管分泌が hOAT3 発現量に伴って変動し、体内消失速度を変動させると予測された。また、最も症例の多いメサンギウム増殖性糸球体腎炎の患者群のみで解析を行うことが可能であった。この患者群では PSP 試験値や hOAT3 mRNA 発現量とセファゾリン消失速度との相関係数が、全患者群で解析を行った場合と比較して高かった。特に尿細管分泌が薬物排泄に及ぼす影響の大きい疾患ではトランスポータ発現量に関する情報を基盤として、薬物の体内動態予測系を構築し得ることが示唆された。hOAT3 遺伝子多型について解析を行ったが、PSP やセファゾリンの腎排泄に影響する多型は見出されなかった。データベース上に登録されている hOAT3 遺伝子多型の頻度は低く、腎有機アニオン排泄に及ぼす hOAT3 遺伝子多型の影響は小さいと予測された。

E. 結論

尿細管分泌される薬物の体内消失速度を予測するためには、糸球体濾過に加えトランスポータ発現変動に関する情報が有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

現時点では特にはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohashi, S., Abe, H., Takahashi, T., Yamamoto, Y., Takeuchi, M., Arai, H., Nagata, K., Kita, T., Okamoto, H., Yamamoto, H., Doi, T.: Advanced glycation end products increase collagen-specific chaperone protein in mouse diabetic nephropathy. *J. Biol. Chem.* 279, 19816-19823 (2004)
- 2) Abe, H., Matsubara, T., Iehara, N., Nagai, K., Takahashi, T., Arai, H., Kita, T., Doi, T.: Type IV collagen is transcriptionally regulated by Smad1 under advanced glycation end product (AGE) stimulation. *J. Biol. Chem.*, 279, 14201-14206 (2004)
- 3) Arai, H., Mizuno, A., Matsuo, K., Fukaya, M., Sasaki, H., Arima, H., Matsuura, M., Taketani, Y., Doi, T., Takeda, E.: Effect of a novel palatinose-based liquid balanced formula (MIIN-01) on glucose and lipid metabolism in male Sprague-Dawley rats after short- and long-term ingestion. *Metabolism.* 53, 977-83 (2004)
- 4) Takahashi T, Abe H, Arai H, Matsubara T, Nagai K, Matsuura M, Iehara N, Yokode M, Nishikawa S, Kita T, Doi T.: Activation of STAT3/Smad1 Is a Key Signaling Pathway for Progression to Glomerulosclerosis in Experimental Glomerulonephritis. *J. Biol. Chem.* 280, 7100-7106. (2005)
- 5) Nagai, K., Matsubara, T., Mima, A., Sumi, E., Kanamori, H., Iehara, N., Fukatsu, A., Yanagida, M., Nakano, T., Ishimoto, Y., Kita, T., Doi, T., Arai, H.: Gas6 induces Akt/mTOR-mediated mesangial hypertrophy in diabetic nephropathy. *Kidney Int*, in press

2. 学会発表

- 1) Nagai K, Matsubara T, Mima A, Sumi E,

Kanamori H, Yanagita M, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T, Arai H. Abolition of Gas6 Inhibits the Development of Diabetic Nephropathy by Inhibiting Akt/mTOR-Mediated Mesangial Hypertrophy. American Diabetes Association, 64th Scientific Sessions (June 2004, U.S.A.)

2) Abe H, Matsubara T, Iehara N, Nagai K, Takahashi T, Arai H, Kita T, Doi T. Type IV Collagen Is Transcriptionally Regulated by ALK1/Smad1 Signaling in Diabetic Nephropathy. American Diabetes Association, 64th Scientific Sessions (June 2004, U.S.A.)

3) Mizuno A, Arai H, Takeda E, Doi T. Disturbed Early Phase Insulin Secretion in Prediabetic Subjects with Obesity. American Diabetes Association, 64th Scientific Sessions (June 2004, U.S.A.)

4) Arai H, Mizuno A, Sasaki H, Doi T, Takeda E. Usefulness of Novel Palatinose-Based Liquid Formula (Inslow) Loading Test for the Selection of Therapy in the Patients with Type 2 Diabetes. Diabetes Association, 64th Scientific Sessions (June 2004, U.S.A.)

5) Nagai K, Matsubara T, Mima A, Sumi E, Kanamori H, Yanagita M, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T, Arai H. Ameliorated Change in Diabetic Nephropathy and Reduced Activation of Akt in Gas6 Knockout Mice. ASN renal week 2004 (October 2004, U.S.A.)

6) Shono A, Tsukaguchi H, Yoita E, Nameta M, Ymamoto T, Doi T. Biochemical Evidence That Podocin Mediates a Multiple Cellular Function through Forming a Distinct Subpopulation of Lipid Microdomain Rafts in Podocytes. ASN renal week 2004 (October 2004, U.S.A.)

7) Takahashi T, Abe H, Matsubara T, Nagai K, Matsuura M, Iehara N, Kita T, Arai H, Doi T. Overexpression of STAT3/Smad1 Participate in Progression to Glomerulosclerosis from Mesangial Cell Proliferation in Experimental Glomerulonephritis. ASN renal week 2004 (October 2004, U.S.A.)

8) Abe H, Ohashi S, Takahashi T, Arai H, Kita T, Doi T. Advanced Glycation End-Products (AGEs) Inducible Genes-Collagen Specific Chaperon and TGF- β /ALK1/Smad1 Signaling-Are Involved in

Diabetic Glomerulosclerosis. ASN renal week 2004 (October 2004, U.S.A.)

9) Matsubara T, Abe H, Nagai K, Takahashi T, Mima A, Kanamori H, Iehara N, Fukatsu A, Arai H, Kita T, Doi T. Induction of Smad1 Is Critical for Glomerulosclerosis in Diabetic Nephropathy. ASN renal week 2004 (October 2004, U.S.A.)

Kitamura A, Tsukaguchi H, Cheong I.I. H, Kagami S, Hattori M, Ikeda M, Nozu K, Yoshikawa N, Doi T, Choi Y, Iijima K. Genetic Scanning for 12 Asian Families with Steroid Resistant Nephrotic Syndrome (SRN) Based on Haplotype Analysis and Computer Simulation Approach. ASN renal week 2004 (October 2004, U.S.A.)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

腎薬物トランスポータタンパク質の発現及び局在変動に関する研究

分担研究者 深津 敦司 京都大学医学部附属病院人工腎臓部講師

【研究要旨】

ヒト病腎組織における薬物トランスポータ群の発現・分布について免疫組織学的解析を実施した。比較的形態の保たれている尿細管側底膜には hOAT1、hOAT3 及び hOCT2 タンパク質の発現が保持されていた。hOCT2 タンパク質の局在と N-methyl nicotineamide (NMN) クリアランスとの間に対応がみとめられた。従って、hOCT2 発現分布の低下に伴って腎有機カチオン排泄能が低下することが示唆された。

A. 研究目的

腎機能障害を有する患者への薬物投与時には、薬物の選択と投与方法に留意する必要がある。これまで主任研究者らによって、ヒト正常腎及び腎疾患時における薬物トランスポータ mRNA の発現について研究が進められてきた。遺伝子発現変動に加えて各種腎疾患におけるトランスポータタンパク質群の発現変動と薬物腎排泄能との関連を明らかにすることによって、腎疾患時における薬物動態の予測精度を上昇させ腎障害進展の予防に貢献できると考える。

B. 研究方法

各種腎疾患にて採取された腎生検試料を用いて、腎組織の病変と hOAT1、hOAT3 および hOCT2 タンパク質の発現について調べた。本研究では京都大学医学部附属病院において腎生検が施行され、本研究について承諾の得られた 20 名の患者を対象とした。疾患は組織学的に診断によって判定した。また、腎機能検査値を含む生化学的検査値は臨床情報を用いた。トランスポータタンパク質の発現は、余剰の腎生検試料を使い各トランスポータ特異的なポリクローナル抗体を用いた間接免疫蛍光抗体法で調べた。組織障害は免疫染色に用いた部位の隣接組織切片を用い、病変を組織学的に検索し半定量的に評価した。慢性病変として尿細管の萎縮、間質の線維化、細胞浸潤、急性病変として尿細管細胞の脱落、変性、拡張の程度を 4 段階に半定量化した。

（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を優先する。すなわち、1)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、2)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、3)血液や組織由来の核酸が他の目的に使用されないこと、4)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、5)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、6)実施対象者の個人識別情報は連結可能匿名化方式で厳重に管理・保護されること、を遵守する。本研究では、腎薬物トランスポータ遺伝子の解析結果と薬物動態・薬物毒性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、連結可能匿名化方式での管理・保護が必要と考えられる。腎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。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する。なお、本研究計画の実施（血液及び腎生検試料の一部を用いた薬物トランスポータ遺伝子の発現並びに遺伝多型・変異解析）にあたり、「腎に発現する薬物輸送体の発現量定量と遺伝子解析に関する臨床研究」という題目で京都大学医学研究科・医学部医の倫理委員会より平

成12年8月23日に承認書が交付されている。さらに平成13年3月29日の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、実施期間を遡って再度承認申請し、平成14年11月20日付けで承認書が交付されている。

C. 研究成果

本年度は新たに有機カチオン輸送系の機能指標として尿中 NMN クリアランスを導入し、有機カチオントランスポータ群の発現と NMN クリアランスとの対応、組織傷害の進展について解析を加えた。

今回対象とした患者は男性12名、女性8名、年齢は22-73歳であった。血清トランスアミナーゼ活性 (AST、ALT) は正常範囲内であり肝機能は正常である。しかし血清クレアチニン値0.5-4 mg/dl、クレアチニンクリアランスは14-118 ml/min、PSP 試験15分値は3-52%と腎機能障害の程度は様々であった。組織学的診断の結果、障害の程度が異なるメサンギウム増殖性糸球体腎炎が13例、膜性腎症2例、膜性増殖性糸球体腎炎2例、糖尿病性腎症1例、腎硬化症1例、微小変化群1例であった。組織障害を4段階で評価したところ間質の浸潤、尿細管萎縮などとクレアチニンクリアランス、PSP 試験値などの腎機能検査値との間に相関が認められた。

メサンギウム増殖性糸球体腎炎、膜性腎症、膜性増殖性糸球体腎炎の患者群では比較的強い間質障害が起こっている組織も認められた。これらの組織においても形態が保たれている尿細管では hOAT1、hOAT3 及び hOCT2 タンパク質のシグナルが認められ、蛍光シグナルの強度は正常と比較して差は認められていない。一方、萎縮・繊維化の進展にともなって蛍光強度の減弱が認められた。

次に各トランスポータタンパク質の localization について検討した。評価はそれぞれシグナルの認められない0から近位尿細管の広範囲に分布する4までの段階評価とした。その結果、有機カチオントランスポータ hOCT2 の localization の評価値が低いほど、NMN クリアランスが低い結果が得られた。hOAT1 や hOAT3 にも localization 評価値の差が認められる。しかしこれらの値と PSP 試験値やセファゾリン消失速度との関連は見いだせなかった。

D. 考察

正常腎組織では hOAT1、hOAT3 及び hOCT2

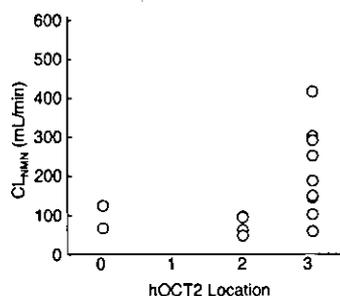


Fig. 1 hOCT2 localization と NMN クリアランス

タンパク質が近位尿細管側底膜に発現することを既に明らかにしている。本年度は各病理標本について組織障害の進展度を評価すると同時にトランスポータタンパクの発現についても段階評価を導入し薬物腎排泄能との変動について検討した。まず組織傷害の進展と薬物トランスポータタンパク質の発現について相関解析を行ったところ、腎組織障害の指標は各尿細管における発現量減少よりも局在範囲の縮小と対応することが示唆された。一方、NMN クリアランスが hOCT2 タンパク質の局在の低下にともなって低値を示す傾向が認められている。クレアチニンクリアランス値を用いて、見かけの NMN 分泌クリアランスを算出し、hOCT2 localization との対応について検討したところ NMN クリアランスと同様の結果が得られている。すなわち、尿細管側底膜で血管から腎組織への移行を媒介する hOCT2 タンパク質が発現する細胞数が減少することで腎有機カチオン排泄能が低下する可能性が考えられる。一方、hOCT2 シグナルが認められているもの NMN クリアランスや NMN 分泌クリアランスが低い値を示す患者が存在する。有機カチオン輸送には刷子縁膜側の輸送系も関与するがその分子実体は不明である。今後、刷子縁膜のカチオン輸送体が明確になることで腎有機カチオン排泄の変動の全容解明が期待される。

E. 結論

腎有機カチオン排泄は、hOCT2 タンパクの低下によって減少することが示唆された。しかし、hOCT2 タンパクが正常と同程度発現しても NMN クリアランスが低下している患者が存在していることから、側底膜トランスポータ発現変動以外の影響因子も考慮する必要がある。

F. 健康危険情報
現時点では特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kozaki, K., Fukatsu, A., Kasahara, M., Ogura, Y., Egawa, H., Tanaka, K.: The role of apheresis therapy in living donor liver transplantation. *Ther. Apher. Dial.*, **8**(3):174-179. (2004)

2. 学会発表

1) Tanaka, Y., Hirahara, I., Kitajima, T., Yamamoto, T., Iehara, N., Fukatsu, A.: Rapid Regeneration of Peritoneal Mesothelium by Hybrid Epidermal Growth Factor Fused with Fibronectin Collagen Binding Domain. ASN renal week 2004 (October 2004, U.S.A.)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表
雑誌

| 発表者の氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|------------------|--|--------------------------------|----------|---------|------|
| Sakurai et al. | Expression levels of renal organic anion transporters (OATs) and their correlation with anionic drug excretion in patients with renal diseases | Pharm. Res. | 21(1) | 61-67 | 2004 |
| Terada et al. | Genetic variant Arg57His in human H ⁺ /peptide cotransporter 2 causes a complete loss of transport function | Biochem. Biophys. Res. Commun. | 316(2) | 416-420 | 2004 |
| Uwai et al. | Common single nucleotide polymorphisms of MDR1 gene have no influence on its mRNA expression levels of normal kidney cortex and renal cell carcinoma in Japanese nephrectomized patients | J. Hum. Genet. | 49(1) | 40-45 | 2004 |
| Terada et al. | Peptide transporters: structure, function, regulation and application for drug delivery | Curr. Drug Metab. | 5(1) | 85-94 | 2004 |
| Urakami et al. | Creatinine transport by basolateral organic cation transporter hOCT2 in the human kidney. | Pharm. Res. | 21(6) | 982-987 | 2004 |
| Horiba et al. | Gene expression variance based on random sequencing in rat remnant kidney. | Kidney Int. | 66(1) | 29-45 | 2004 |
| Motohashi et al. | Different transport properties between famotidine and cimetidine by human renal organic ion transporters (SLC22A). | Eur. J. Pharmacol., | 503(1-3) | 25-30 | 2004 |
| Kimura et al. | Metformin Transport by Renal Basolateral Organic Cation Transporter hOCT2. | Pharm. Res., | 22(2) | 255-259 | 2005 |

Expression Levels of Renal Organic Anion Transporters (OATs) and Their Correlation with Anionic Drug Excretion in Patients with Renal Diseases

Yuji Sakurai,¹ Hideyuki Motohashi,¹ Harumasa Ueo,¹ Satoshi Masuda,¹ Hideyuki Saito,¹ Masahiro Okuda,¹ Noriko Mori,² Motokazu Matsuura,³ Toshio Doi,³ Atsushi Fukatsu,⁴ Osamu Ogawa,⁵ and Ken-ichi Inui^{1,6}

Received August 2, 2003; accepted September 19, 2003

Purpose. Because the urinary excretion of drugs is often decreased in renal diseases, dosage regimens are adjusted to avoid adverse drug reactions. The aim of present study was to clarify the alteration in the levels of renal drug transporters and their correlation with the urinary drug excretion in renal diseases patients.

Methods. We quantified the mRNA levels of human organic anion transporters (hOATs) by real-time polymerase chain reaction and examined the excretion of the anionic drug, cefazolin, in renal disease patients. Moreover, transport of cefazolin by hOAT1 and hOAT3 were examined using HEK293 transfectants.

Results. Among four hOATs, the level of hOAT1 mRNA was significantly lower in the kidney of patients with renal diseases than in the normal controls. The elimination constant of cefazolin showed a significant correlation with the values of phenolsulfonphthalein test and mRNA levels of hOAT3. The uptake study using HEK293 transfectants revealed that cefazolin and phenolsulfonphthalein were transported by hOAT3.

Conclusions. These results suggest that hOAT3 plays an important role for anionic drug secretion in patients with renal diseases and that the expression levels of drug transporters may be related to the alteration of renal drug secretion.

KEY WORDS: organic anion transporter; renal diseases; human kidney; renal tubular secretion; real-time PCR.

INTRODUCTION

Renal impairments often decrease the rate of drug excretion into urine, and optimal dosage regimens must be designed to avoid adverse effects. For many drugs which are eliminated by the kidney, dosage regimens are usually adjusted according to creatinine clearance with a simple equation (1). However, it is accepted that the creatinine clearance

(CL_{cr}) reflects only the glomerular filtration rate of normal kidney, and there are some discrepancies between the true glomerular filtration rate and CL_{cr} in patients with renal insufficiency. In addition, numerous ionic drugs are secreted into urine by the transporters localized in the proximal tubules. Indeed, the dosage schedule based on CL_{cr} was inadequate for ampicillin and cephalexin dosing in some patients with renal insufficiency (2). The adjustment method of the cephalexin dosage regimen, in which CL_{cr} and phenolsulfonphthalein test were simultaneously considered, appeared to be more useful than the conventional CL_{cr} method (3). Most of the phenolsulfonphthalein excretion into urine depends on the tubular secretion mediated by the organic anion transport systems (4). Although the dosage adjustment method, considering the ability of renal tubular secretion, may be useful for patients with renal diseases, little information is available about the expression profiles of the organic ion transporters in renal diseases.

Both renal secretion and reabsorption across the tubular epithelium are mediated by various transporters, which are expressed in the apical and basolateral membranes of tubular epithelial cells (5–7). Human organic anion transporter hOAT1 was isolated from the kidney and was suggested to be the *p*-aminohippurate/dicarboxylate exchanger (8,9). We previously clarified that the expression level of hOAT1 was the second highest among the organic ion transporters (SLC22A) and that hOAT1 was located at the basolateral membrane of the proximal tubules (10). It was suggested that hOAT1 mediated the basolateral uptake into the epithelial cells from the blood circulation. Human (h)OAT2 was also expressed in the basolateral membrane of renal tubular epithelium (11). Human OAT3 was isolated from the kidney (12). The expression levels of hOAT3 mRNA was the highest among organic ion transporter family in the human kidney, and hOAT3 protein was detected in the basolateral membrane of the proximal tubules (10). Recently, Sweet *et al.* (13) established the Oat3 knockout mouse. Although the generated Oat3^{-/-} mice were fertile and exhibited no obvious morphological defects, the uptake of taurocholate, estrone sulfate, and *p*-aminohippurate in renal slices prepared from Oat3^{-/-} mice were greatly reduced in comparison with wild-type mice, suggesting OAT3 may play an important role for basolateral anion transport of the proximal tubules. Human OAT4 was also expressed in the kidney, whereas it was localized to the apical side of the proximal tubules (14). These hOATs mediate the transport of various drugs and contribute to the renal drug excretion (6).

The purpose of this study is to clarify the expression levels of renal hOATs in the patients with renal diseases and their correlation with the rate of the anionic drug elimination. We quantified the mRNA levels of renal organic anion transporters in the normal parts of kidney cortex from surgically nephrectomized patients and in the renal biopsy specimens from patients with renal diseases. In addition, elimination of the anionic drug, cefazolin was assessed to compare with the expression levels of renal transporters or the 15- or 120-min value of the phenolsulfonphthalein test (PSP15' or PSP120'). The transport characteristics of phenolsulfonphthalein and cefazolin by HEK293 transfectants with hOAT1 or hOAT3 were also examined.

¹ Department of Pharmacy, Kyoto University Hospital, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan.

² Department of Nephrology, Shizuoka Prefectural Hospital, Shizuoka, Japan.

³ Department of Clinical Biology and Medicine, University of Tokushima, Tokushima, Japan.

⁴ Division of Artificial Kidneys, Kyoto University Hospital, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan.

⁵ Department of Urology, Kyoto University Hospital, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan.

⁶ To whom correspondence should be addressed. (e-mail: inui@kuhp.kyoto-u.ac.jp)

MATERIALS AND METHODS

Normal Parts of the Kidney Cortex and Renal Biopsy Samples

Normal parts of human kidney cortex were obtained from 35 surgically nephrectomized patients with renal cell carcinoma or transitional cell carcinoma at Kyoto University Hospital (24 males and 11 females; age, 64.1 ± 7.9 year [mean \pm SD]). These patients did not have any diseases that affected the kidney other than the carcinoma. Human kidney biopsy samples for the diagnosis were from 42 patients with various renal diseases at Tokushima University Hospital and Shizuoka Prefectural Hospital (24 males and 18 females; age, 39.2 ± 19.3 year [mean \pm SD]). The characteristics of these patients are summarized in Table I. The patients had various renal diseases that were histologically confirmed as lupus nephritis ($n = 4$), IgA nephropathy ($n = 11$), focal glomerular sclerosis ($n = 4$), membranoproliferative glomerulonephritis ($n = 3$), membranous glomerulonephropathy ($n = 6$), mesangial proliferative glomerulonephropathy ($n = 8$), and other nephropathies ($n = 6$). Kidney biopsy specimens were histologically confirmed to contain the cortical proximal tubules using the adjacent sections. The values of clinical tests, such as CL_{cr} , PSP15', or PSP120', were routinely measured in the hospital. After phenolsulfonphthalein (6 mg) was administered intravenously, urine samples were collected at 15 and 120 min. The amounts of phenolsulfonphthalein in urine samples were represented as % of the initial dose. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and its amendments and was approved by Kyoto University Graduate School and Faculty of Medicine, Ethics Committee. All patients gave their written informed consent.

Quantification of Organic Anion Transporter mRNA Expression

The expression levels of the drug transporters were quantified as described previously (10). Briefly, total cellular RNA was isolated from specimens using a MagNA Pure LC RNA isolation Kit II (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) and was reverse-transcribed to yield cDNA. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using the ABI PRISM 7700 sequence detector system (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was also quantified as an internal control with GAPDH Control Reagent (Applied Biosystems).

Table I. Characteristics of the Patients

| | Nephrectomized patients | Patients with renal diseases |
|-----------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Age (years) | 64.1 ± 7.9 | 39.2 ± 19.3 |
| Males/females | 24/11 | 24/18 |
| Aspartate aminotransferase (IU/l) | 25.8 ± 16.3 | 19.4 ± 10.2 |
| Alanine aminotransferase (IU/l) | 25.8 ± 19.2 | 19.8 ± 21.5 |
| Lactate dehydrogenase (IU/l) | 190.4 ± 76.5 | 175.5 ± 44.8 |
| Serum creatinine (mg/dl) | 0.85 ± 0.22 | 1.3 ± 1.9 |
| Uric acid (mg/dl) | 5.4 ± 1.7 | 6.2 ± 1.7 |
| Blood urea nitrogen (mg/dl) | 15.2 ± 4.8 | 18.7 ± 13.9 |
| Creatinine clearance (ml/min) | 77.6 ± 25.8 | 58.8 ± 24.4 |

Calculation of the Apparent Elimination Constants and Renal Secretion of Cefazolin

After the renal biopsy, the patients received 1 g of cefazolin by 1 h intravenous infusion for the prophylaxis of infections. The blood samples of the patients were collected immediately and at 1 h after the infusion. To 100 μ l of collected plasma, 200 μ l of methanol and 50 μ l of cefotiam (100 μ g/ml), as an internal standard, were added. After standing for 1 h at room temperature, the mixtures were centrifuged and the supernatants were filtered through a Millipore filter (SJGVL, 0.45 μ m, Bedford, MA, USA). The filtrate was analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) as described below, and the apparent elimination constant (Ke_{ce}) was calculated using the plasma concentration at immediately and 1 hr after cefazolin infusion. A high-performance liquid chromatography (LC-10AS, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) equipped with a UV spectrophotometric detector (SPD-10AV, Shimadzu) was used for the analysis of cefazolin. The conditions were as follows: column, Zorbax ODS column 4.6 mm inside diameter \times 150 mm (Du Pont, Wilmington, DE, USA); mobile phase, 30 mM phosphate buffer (pH 7.0):methanol = 80:20; flow rate, 1.0 ml/min; wavelength, 272 nm; injection volume, 50 μ l; temperature, 40°C.

Uptake of *p*-Aminohippurate and Estrone Sulfate by HEK293 Cells Transfected with hOAT1 or hOAT3 cDNA, Respectively

Human OAT1 cDNA was isolated from Triplex™ human kidney cDNA library (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA) and hOAT3 cDNA was from the Human Kidney Rapid-Screen™ cDNA Panel (OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) according to the instruction manuals. Isolated cDNAs were sequenced using a fluorescence 373A DNA sequencer (Applied Biosystems), and were subcloned into pBK-CMV plasmid vector (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Cell culture, transfection of cDNA, and uptake studies were performed as described previously (15) with some modifications. Briefly, the day before transfection, HEK293 cells were seeded on poly-D-lysine-coated 24-well plates at a density of 2×10^5 cells/well. The cells were transfected with plasmid cDNA using LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). At 48 h after transfection, the uptake of *p*-[¹⁴C]aminohippurate or [³H]estrone sulfate by the HEK293 cells was examined. The composition of the incubation medium was as follows (in mM): 145 NaCl, 3 KCl, 1 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 5 D-glucose, and 5 HEPES (pH 7.4). The cells were preincubated with 0.2 ml of incubation medium for 10 min at 37°C. After the preincubation, medium was replaced with 0.2 ml of the incubation medium containing 5 μ M *p*-[¹⁴C]aminohippurate or 18.8 nM [³H]estrone sulfate. At the end of incubation period, the medium was aspirated, and then cells were washed two times with 1 ml of ice-cold incubation medium. The cells were lysed in 0.5 ml of 0.5 N NaOH solution, and the radioactivity in aliquots was determined in 5 ml of ACSII (Amersham International, Buckinghamshire, UK). The protein contents of the solubilized cells were determined by the method of Bradford (16) using the Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with the bovine γ -globulin as a standard.