

200400281B

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15～16年度 総合研究報告書

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	11
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	16

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	20
-----------------	----

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。本研究では腎薬物トランスポータ群を薬物の腎排泄ならびに腎蓄積に伴う障害発現の両面に関わる因子と想定し、薬物トランスポータの機能特性・遺伝子多型並びに発現変動について解析した。正常腎組織において最も高発現している有機アニオントランスポータ hOAT1、hOAT3 ならびに hOAT4 について検討したところ、hOAT3 及び hOAT4 はセフェム系抗生物質及び腎機能検査薬フェノールスルホフタレインを輸送したが、hOAT1 はセフェム系抗生物質をほとんど輸送しないことなど、トランスポータ間で基質認識特性が異なることが示された。また PSP が hOAT1 や hOAT3 と同様に hOAT4 によっても輸送されたことから、PSP 試験値は hOAT1 や hOAT3、hOAT4 を介した尿細管分泌能の指標となると考えられた。一方、クレアチニンが hOCT2 によってのみ輸送されることを見出した。これまで問題点として指摘されてきたクレアチニククリアランスが真の糸球体濾過速度と必ずしも一致しないことは、hOCT2 を介した尿細管分泌に起因することが示唆された。

腎組織におけるトランスポータ発現量の検討において、hOAT1 の発現量が正常腎組織と比較して腎疾患患者の腎組織では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 hOCT2 も減少傾向を示すものの hOAT2 は維持されており、トランスポータごとに異なった発現変動が認められた。一方、腎生検後に投与されるセファゾリンをモデル薬物として消失速度を算出したところ、クレアチニククリアランスよりも PSP 試験値と良好な相関を示すこと、hOAT3 発現量と有意な相関を示すことが明らかとなった。さらにメサンギウム増殖性糸球体腎炎患者群を抽出することで相関係数は顕著に上昇したことから、トランスポータ発現量は薬物腎排泄能の規定因子であるが、さらに原疾患に影響を受けることが示唆された。

薬物動態制御因子としてトランスポータ遺伝子多型について検討した結果、hOAT3 や hOCT1、ペプチドトランスポータ hPEPT2 の輸送活性を変動させる nonsynonymous mutation を見出した。3 種の hOCT1 変異体では輸送活性が消失または低下し、hPEPT2 の R57H 変異体でも輸送活性がほぼ完全に消失した。また hOAT3 の I305F 変異によってセファゾリン輸送は上昇するが PSP 輸送は低下することが明らかとなった。この hOAT3 遺伝子多型をヘテロ型で有する患者が 3 名存在したが、変異を有する患者とそれ以外の患者との間には 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。

以上より尿細管薬物トランスポータの機能および発現変動に関する情報は、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

本邦における活力ある高齢化社会実現のためには、高度で安全な高齢者医療の推進が不可欠である。高齢者の薬物療法における問題点として、1)潜在的に腎機能が低下しており薬物の排泄が遅延する、2)薬物排泄能力の減少に伴って薬剤性腎障害の発症頻度が高くなる、3)発症した腎不全は進行性・不可逆性である場合が多い、4)排泄遅延の結果、薬物の血中濃度が上昇し副作用が惹起される等があげられる。これら問題点への対処法は、腎機能に応じた薬物投与設計と副作用発現の早期発見である。しかし、高齢者において腎障害を惹起する薬物は多岐にわたること、想定される副作用発現機序が複雑であること、他の年齢層と比較して薬物排泄能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要因となっている。従って、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し、至適薬剤投与設計を行うことによって、高齢者薬物療法に付随する副作用の発現を未然に回避することが可能になると考えられる。以上の理由から高齢者の健康を増進し、安心して生活できる高齢化社会への転換に取り組む長寿科学総合研究事業の一環として本研究計画を立案した。

近年、腎臓に発現する薬物排泄タンパク質（薬物トランスポータ）群として以下の遺伝子ファミリーが同定され、役割解明が進められている。

- 1)有機アニオントランスポータ（OAT 遺伝子ファミリー）
 - 2)有機アニオントランスポータ（oatp(OAT-K)遺伝子ファミリー）
 - 3)有機カチオントランスポータ（OCT(N)遺伝子ファミリー）
 - 4)ペプチドトランスポータ（PEPT 遺伝子ファミリー）
 - 5)ATP 駆動型有機イオントランスポータ（ABC 遺伝子スーパーファミリー）
- 特に血管側に発現する有機アニオントランスポータ

群や有機カチオントランスポータ群は尿細管上皮細胞内への薬物移行を媒介するため、腎排泄ならびに腎蓄積に伴う障害発現の両面に関わる因子であると想定される。既に至適投与設計法を確立するための基盤として、正常腎組織における薬物トランスポータ群の発現量を明らかにしてきた。本研究ではこれらの基礎情報をもとに、薬物トランスポータの機能特性・遺伝子多型並びに発現変動について解析を行う。高齢者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因子を解明し、個別薬剤投与設計へ応用することによって高齢者の医薬品適正使用を推進することを本研究計画の目標とする。

B. 研究方法

1. ヒト型薬物トランスポータの機能解析

正常腎組織で高発現し、薬物腎排泄において主要な役割を担う有機イオントランスポータの機能特性について検討した。ヒト有機イオントランスポータ遺伝子を導入したヒト胎児腎由来293細胞を用い、細胞内への薬物取り込み量を測定することによって輸送機能を評価した。

2. 腎疾患患者における薬物トランスポータ群の発現変動に関する解析

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。各薬物トランスポータ群の発現レベルについては、各組織検体から total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いてトランスポータ発現量を数値化した。併せて生化学的検査値などの臨床情報を収集した。さらに、腎生検施行後、感染症予防を目的として投与する抗生物質セファゾリンをモデル薬物として血中濃度を測定し、排泄速度を算出した。また内因性の N-methyl nicotinamide (NMN) をカチオン性モデル基質として尿中排泄速度について検討した。

3. 一塩基多型による薬物トランスポータの機能変動に関する解析

薬物腎排泄において主要な役割を果たすトランスポータ遺伝子の変異は、薬物の尿中排泄速度の規定因子となることが想定される。本邦の Japanese Single Nucleotide Poly-morphisms や 米国 National Center for Bio-technology Information などの公的データベースには薬物トランスポータ遺伝子の一塩基多型(SNPs)に関する情報が蓄積され

ている。既知の遺伝子多型について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。また新規遺伝子多型の可能性も考慮して、薬物体内動態とトランスポータ発現量との相関において外れ値と想定される患者群を対象として直接シーケンス法にて塩基配列を決定した。なお、これらの情報から得られた nonsynonymous SNPs のトランスポータ機能に及ぼす影響については培養細胞系並びに卵母細胞系を用いて検討した。

(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) ヒト型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

正常腎組織では hOAT1 と hOAT3 が他の薬物トランスポータと比較して高い発現量を示しており、薬物腎排泄において主要な役割を果たすと考えられる。これらトランスポータの機能解析を効率的に進めるため、ヒト胎児腎由来 293 細胞を用いて安定発現細胞系を構築した。なお、各安定発現細胞による代表的基質の輸送、各トランスポータ mRNA 並

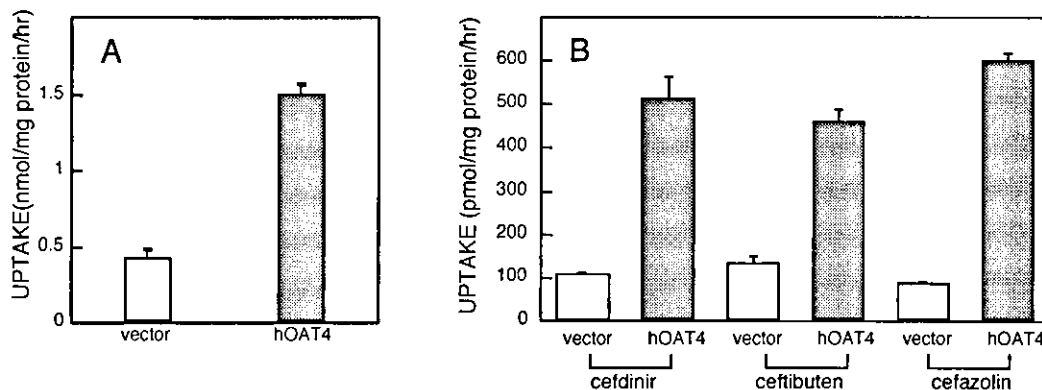


Fig. 1 有機アニオントランスポータ hOAT4 による PSP(A)及びセフェム系抗生物質(B)の輸送

びにタンパク質の発現については確認済みである。これらの細胞を用いて、尿細管分泌されることが知られているセフェム系抗生物質の輸送について検討した。その結果、これら抗生物質はすべて hOAT1 及び hOAT3 を阻害した。しかし輸送活性については、検討した8種すべてで顕著に hOAT3 によって輸送された。従って hOAT1 と hOAT3 との間には阻害実験のみでは評価しきれない基質認識特性の違いがあることが示された。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、腎機能検査薬パラアミノ馬尿酸などは hOAT1 に輸送された。

hOAT1、hOAT3 は尿細管側底膜に発現するのに対し、hOAT4 は刷子縁膜に発現する。薬物の尿細管分泌においては、側底膜と刷子縁膜に発現する薬物トランスポータ群が協調して働くことが想定されている。これまでに腎機能検査薬フェノールスルホンフタレイン(PSP)の腎取り込みに hOAT1 及び hOAT3 が関与することを示してきたが、さらに hOAT4 によって PSP が輸送されることが明らかとなった。またセファゾリンやセフジニル、セフチブテン等のセフェム系抗生物質も hOAT4 によって輸送されることが示された(Fig 1)。

・有機カチオントランスポータの機能解析

クレアチ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ンクリアランスは腎機能の指標として広く用いられている。しかし尿細管分泌過程が寄与するため真の糸球体濾過速度とは差が認められ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、クレアチニン輸送について検討した。その結果クレアチニンは hOCT1 には輸送されず、hOCT2 によってのみ輸送された(Fig. 2A)。また有機アニオン輸送体 hOAT1 や hOAT3 などには輸送されなかった。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 2B, C)。各薬物の IC₅₀ 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と推察された。

2) 腎疾患時における薬物トランスポータの発現変動

病理診断を目的として腎生検が施行された患者の余剰組織検体を用いて、薬物トランスポータ mRNA 発現量を測定した(Fig. 3)。最終的に 114 症例について解析した。その結果、hOAT1 の発現量が正常腎皮質と比較して顕著に低下していることが明らかとなった。また hOAT3 や hOCT2 発現量も低下傾向を示す一方、hOAT2 の発現量は維持されており、各トランスポータが腎疾患時において異なった発現変動を示すことが示唆された。腎組織における薬物トランスポータ発現量には年齢による有意な差は認められておらず、発現量の個人差に及ぼす年齢の影響は小さいと推察された。

3) 腎疾患患者における薬物体内動態の変動

腎生検では、検体採取後に感染症を予防するため抗生剤が投与される。本研究ではセフェム系抗生物質セファゾリンの消失速度について、尿細管分泌される薬物のモデルとして検討した。セファゾリンは1時間の定速静注にて投与され、点滴終了直後と1時間後に血中濃度を測定し、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

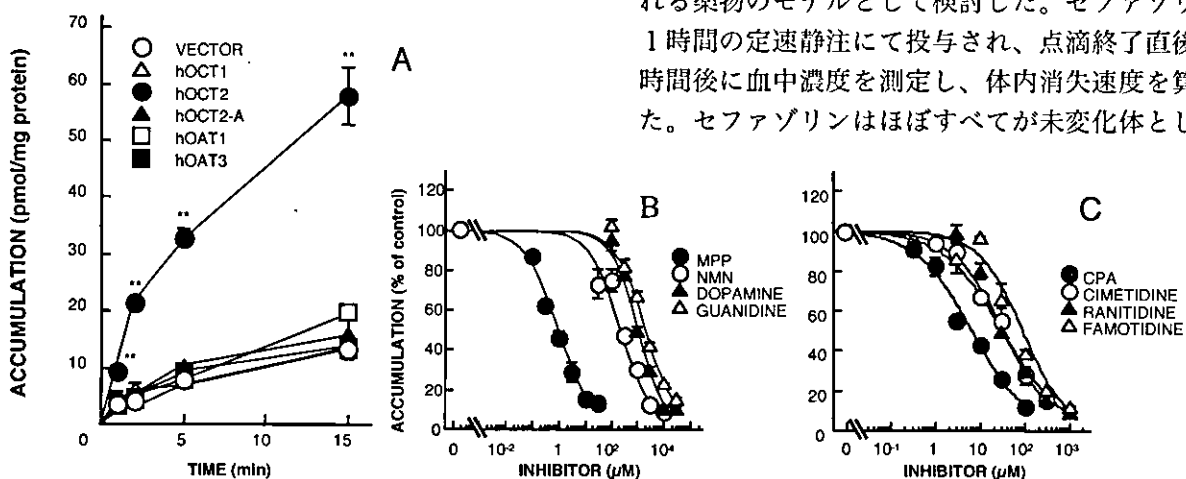


Fig. 2 hOCT2によるクレアチニン輸送(A)及びカチオン性薬物による阻害効果(B,C)

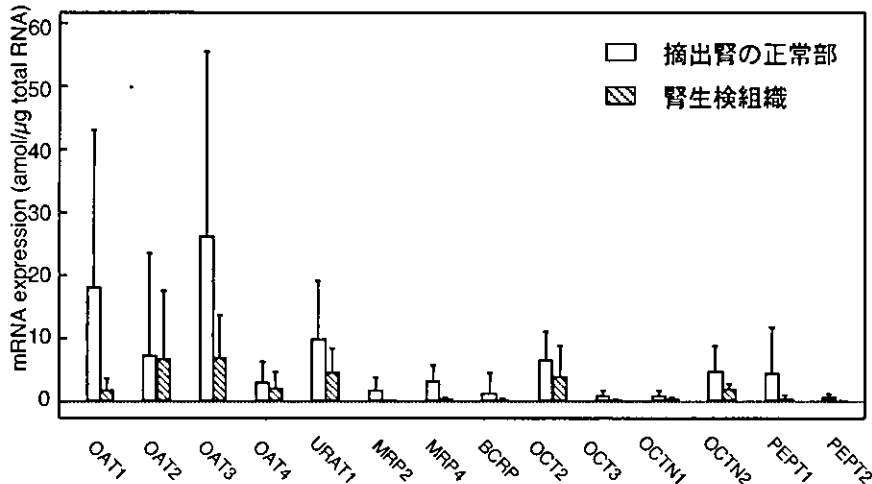


Fig. 3 腎疾患患者における薬物トランスポータの発現変動

中に排泄されるため、その消失速度は腎臓による排泄能変動を反映していると考えられる。また生理的 pH で負電荷を有していることから、有機アニオン輸送系を介して排泄されると予想される。腎疾患患者群において、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($r=0.44$)よりも PSP 検査値($r=0.71$)と高い相関を示すことが明らかとなった。

セファゾリンの消失速度と種々アニオントランスポータ発現量との相関解析を行ったところ、hOAT3のみと有意な相関を示した(Fig. 4; $r=0.54$)。腎疾患は各疾患によって多様な病態を示すことから、さらに疾患分類をおこない再解析した。その結果、hOAT3とセファゾリンの消失速度との相関係数は、メサンギウム増殖性糸球体腎炎患者を抽出することによって顕著に改善された。一方、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 発現量との間に有意な相関は認められなかった。

4) ヒト型トランスポータの遺伝子多型解析

ヒト腎薬物トランスポータ群にはアミノ酸変異を伴う一塩基多型 (nonsynonymous SNPs) が報告され、薬物体内動態の個体間変動の原因となる可能性が想定されている。既に公的データベース上に登録されている有機カチオントランスポータ hOCT1 及びペプチドトランスポータ hPEPT2 の nonsynonymous SNPs について、輸送機能に及ぼす影響を評価した。3カ所の nonsynonymous SNPs から予測される hOCT1 変異体(P283L, R287G, P341L)のうち、P283L 及び R287G 変異体では輸

送活性が消失した(Fig. 5A)。さらに、P341L 変異体では野生型と比較して約 60%にまで輸送活性が低下することが確認された。これら変異体の膜局在について検討したところ、いずれの変異体タンパク質も細胞膜上に発現が認められた。したがって機能低下の原因は細胞膜上における発現量低下ではなく、輸送機能障害または基質認識異常であることが想定された。

一方、ペプチドトランスポータ hPEPT2 変異体 (R57H,P409S)のうち、R57H 変異体では輸送活性がほぼ完全に消失した(Fig. 5B)。R57H 変異体タンパク質は細胞膜上に発現が認められており、hOCT1 変異体と同様に輸送機能障害または基質認識異常が輸送活性低下の原因と推察された。一方、P409S 変異体では野生型と同程度の輸送活性を示した。

さらに hOAT3 遺伝子多型について解析を行った。現在解析の終了している 114名の患者群について、残差解析を行い、残差が高値であった上位 5名を解析対象とした。これら 5名の患者を除外したときの相関係数は $R=0.69$ であり、この患者群を外れ値とみなし、hOAT3 exon 配列を決定した。また既知の遺伝子多型については PCR-RFLP 法によって解析した。その結果 1箇所 の nonsynonymous mutation を見出した。これは 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 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。従ってこの一塩基変異に

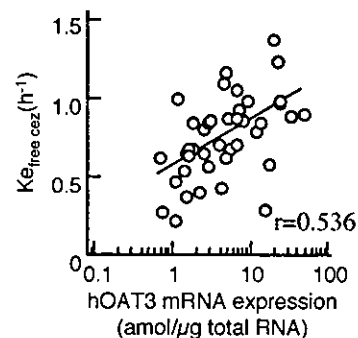


Fig. 4. hOAT3 mRNA 発現量とセファゾリン消失速度との相関

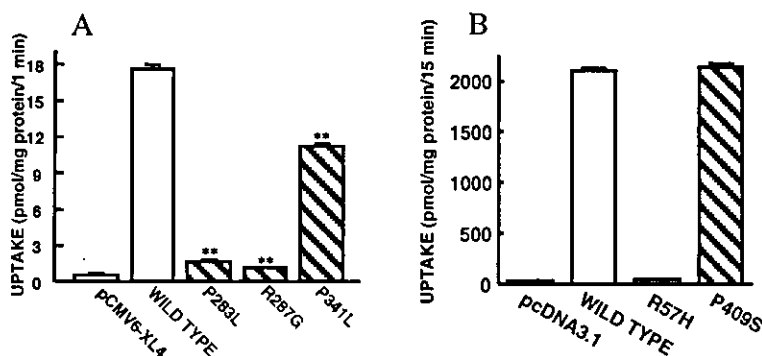


Fig. 5 hOCT1 変異体によるテトラエチルアンモニウムの輸送(A)並びに hPEPT2 変異体によるグリシルザルコシン輸送(B)

よってトランスポータ機能が変動することが示された。また、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%であり変異をホモで有する患者は見出されなかった。NCBI での発現頻度の報告値は 0.9%である。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。

D. 考察

腎臓は薬物排泄の主要な臓器であり、腎機能障害時における薬物投与設計は更なる腎機能悪化などの副作用発現を防ぐために重要である。腎機能低下は、有効ネフロン数の減少に起因し糸球体濾過速度と同様に変動すると考えられている (intact nephron hypothesis)。従って、糸球体濾過速度を反映する血清クレアチニン値やクレアチニンクリアランスなどの腎機能検査値をもとに、薬剤の投与量が調節されている。しかし、腎機能が 50%以上保存されていれば血清クレアチニン値はほぼ正常値を示すこと、クレアチニンクリアランスには尿細管分泌過程が関与することなどが問題とされてきた。本研究でクレアチニンが hOCT2 を介して尿細管分泌されることが示唆され、糸球体濾過速度とクレアチニンクリアランスとの差を呈す原因分子であると考えられる。一方、PSP やセファゾリンの腎排泄には hOAT1 や hOAT3、hOAT4 などを経た尿細管分泌過程が大きく寄与する。本研究ではクレアチニンクリアランスよりも PSP 試験値がセファゾリン消失速度と良好な相関を示した。また NMN クリアランスと PSP やセファゾリン消失速度との間には良好な相

関は得られない。以上の結果は、薬物腎排泄速度はいずれの経路 (トランスポータ) を介して排泄されるかによって、その変動が異なることを示唆している。

hOAT3 発現量がセファゾリンの消失速度と正の相関を示すことから、トランスポータ発現量が腎薬物排泄能を規定する因子となりうるものが推察される。最も症例数の多いメサンギウム増殖性糸球体腎炎の患者群を抽出し検討したところ (詳細は分担研究者・土井の報告書にも記載)、PSP 試験値やセファゾリン消失速度定数、トランスポータ発現量には他の疾患群と比較して有意な差は認められなかったのに対して、hOAT3 mRNA 発現量と PSP 試験値及びセファゾリン消失速度との相関係数が他の患者群と比較して高かった。この結果は、糸球体濾過、尿細管分泌、トランスポータ発現それぞれの変動が各疾患で異なっており、原疾患ごとに分類することによって予測精度が上昇することを示唆している。メサンギ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。これらの患者群でトランスポータ発現量の有用性がみとめられたことは、臨床応用を考える上で大きな意義を持つ。一方、外れ値と想定した患者群にはループス腎炎や、糖尿病性腎症が含まれており、これら患者群での薬物動態について精査が必要であることを示している。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。今後これら患者群でのトランスポータ発現変動メカニズムの解明が必要である。

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だが、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、カチオン排泄能に影響を受けていると考えられる。クレアチニンクリアランスと NMN クリアランスとの差に個人差が大きいことは、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。本年度までの研究ではカチオン分泌速度に及ぼす hOCT2 の寄与率を算出することはできなかったが、今後これらの研究を継続することで尿細管分泌過程の影響因子が明らかにされるものと考えられる。

本研究において、hOCT1 及び hPEPT2 の一塩基多型が輸送活性を変動させることが示された。特に hPEPT2 は近位尿細管刷子縁膜に発現し、ペプチド類似薬物の再吸収に関わっている。今回認められた hPEPT2 遺伝子多型が薬物腎排泄に及ぼす影響については、今後更に検討が必要である。一方 hOAT3 の遺伝子多型に関しては、nonsynonymous SNPs の発現頻度が非常に低いため、薬物腎排泄能に顕著な影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。今後、未知の遺伝子多型が同定される可能性が考えられるが、現状では hOAT3 の遺伝子多型情報よりもトランスポータ発現量が薬物動態において重要な因子と捉えるべきである。

トランスポータ発現量が薬物腎排泄能評価に有用であることが示されたが、これらは主として近位尿細管に発現するため尿細管障害によって影響を受けると推察される。しかし尿細管傷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について検討したがトランスポータ発現量、セファゾリンクリアランス、PSP 試験値、NMN クリアランスなどとの間に有意な相関は得られなかった。この結果は、トランスポータ発現変動が薬物の尿細管分泌能が尿細管のダメージにともなって低下するのみではないことを示している。

E. 結論

尿細管薬物トランスポータの機能特性ならびに発現変動は薬物腎排泄能を規定する重要な因子であり、分子的根拠に基づいた薬物排泄量の予測系を構築し至適投与設計法を確立するための有用な情報である。

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) Ohnishi, S., Saito, H., Fukada, A. and Inui, K.: Distinct transport activity tetraethylammonium from L-carnitine in rat renal brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1609**(2), 218-224 (2003)

2) Fukada, A., Saito, H., Urakami, Y., Okuda, M. and Inui, K.: Involvement of specific transport system of renal basolateral membranes in distribution of nicotine in rats. *Drug Metabol. Pharmacokin.*, **17**(6), 554-560 (2003)

3) Horiba, N., Masuda, S., Takeuchi, A., Takeuchi, D., Okuda, M. and Inui, K.: Cloning and characterization of a novel Na⁺-dependent glucose transporter (NaGLT1) in rat kidney. *J. Biol. Chem.*, **278**(17), 14669-14676 (2003)

4) Goto, M., Masuda, S., Saito, H. and Inui, K.: Decreased expression of P-glycoprotein during differentiation in the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem. Pharmacol.*, **66**(1), 163-170 (2003)

5) Horiba, N., Masuda, S., Ohnishi, C., Takeuchi, D., Okuda, M. and Inui, K.: Na⁺-dependent fructose transport via rNaGT1 in rat kidney. *FEBS Lett.*, **546**(2-3), 276-280 (2003)

6) Okamura, M., Terada, T., Katsura, T., Saito, H. and Inui, K.: Inhibitory effect of zinc on PEPT1-mediated transport of glycylsarcosine and β -lactam antibiotics in human intestinal cell line Caco-2. *Pharm. Res.*, **20**(9), 1389-1393 (2003)

7) Habu, Y., Yano, I., Takeuchi, A., Saito, H., Okuda, M., Fukatsu, A. and Inui, K.: Decreased activity of basolateral organic ion transports in hyperuricemic rat kidney: roles of organic ion transporters, rOAT1, rOAT3 and rOCT2. *Biochem. Pharmacol.*, **66**(6), 1107-1114 (2003)

8) Fukudo, M., Yano, I., Fukatsu, S., Saito, H., Uemoto, S., Kiuchi, T., Tanaka, K. and Inui, K.: Forecasting of blood tacrolimus concentrations based on the Bayesian method in adult patients receiving living-donor liver transplantation. *Clin. Pharmacokin.*, **42**(13), 1161-1178 (2003)

9) Igarashi, T., Yano, I., Saito, H. and Inui, K.: Decreased cyclosporin A concentrations in the

- absorption phase using microemulsion concentrate formulation in rats with cisplatin-induced acute renal failure. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**(11), 1591-1595 (2003)
- 10) Pan, X., Terada, T., Okuda, M. and Inui, K.: Altered diurnal rhythm of intestinal peptide transporter by fasting and its effects on the pharmacokinetics of ceftibuten. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **307**(2), 626-632 (2003)
- 11) Masuda, S., Goto, M., Kiuchi, T., Uemoto, S., Kodawara, T., Saito, H., Tanaka, K. and Inui, K.: Enhanced expression of enterocyte P-glycoprotein depresses cyclosporine bioavailability in a recipient of living donor liver transplantation. *Liver Transplantation*, **9**(10), 1108-1113 (2003)
- 12) Takeuchi, A., Motohashi, H., Okuda, M. and Inui, K.: Decreased function of genetic variants, Pro283Leu and Arg287Gly, in human organic cation transporter hOCT1. *Drug Metabol. Pharmacokin.*, **18**(6), 409-412 (2003)
- 13) Katsura, T. and Inui, K.: Intestinal absorption of drugs mediated by drug transporters: Mechanisms and regulation. *Drug Metabol. Pharmacokin.*, **18**(1), 1-15 (2003)
- 14) Masuda, S.: Functional characteristics and pharmacokinetic significance of kidney-specific organic anion transporters, OAT-K1 and OAT-K2, in the urinary excretion of anionic drugs. *Drug Metabol. Pharmacokin.*, **18**(2), 91-103 (2003)
- 15) 乾 賢一、土井俊夫 編著：改訂腎機能別薬剤使用マニュアル，じほう (2003)
- 16) 乾 賢一：腎排泄(renal excretion)：尿中への排泄。臨床薬理学 (第2版)，中野重行、安原 一、中野真汎編，152-156，医学書院 (2003)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 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. Pharmacokin.*, **19**(2), 41-47 (2004)
- 22) 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)
- 23) 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)
- 24) 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)
- 25) 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)
- 26) 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)

- 27) 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)
- 28) 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)
- 29) 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)
- 30) 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)
- 31) 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)
- 32) 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)
- 33) Irie, M., Terada, T., Okuda, M. and Inui, K.: Efflux properties of basolateral peptide transporter in human intestinal cell line Caco-2. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.*, **449**(2), 186-194 (2004)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) Kimura, N., Okuda, M. and Inui, K.: Metformin Transport by Renal Basolateral Organic Cation Transporter hOCT2. *Pharm. Res.*, **22**(2), 255-259 (2005)
- 37) 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).
- 38) 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 glycy sarcosine and ceftibuten in 5/6 nephrectomized rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **288**(4) G664-G670 (2005).
- 39) 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).
- 40) 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) 乾 賢一、寺田智祐. ペプチドトランスポータとドラッグデリバリー. 日本薬学会第123年会: シンポジウム10「ペプチド・タンパク質の生体膜透過機構とその改善」(2003年3月、長崎)
- 2) 乾 賢一. 医療薬学の科学的基盤構築に向けて: From Bench to Bedside. 日本薬剤学会第18年会: 年会長講演 (2003年4月、京都)
- 3) 乾 賢一. 薬物トランスポータの新しい展開: From Bench to Bedside. 日本膜学会第25年会: 特別講演 (2003年5月、東京)
- 4) 乾 賢一. これからの薬剤師業務と科学的基盤構築へ向けて. 第10回熊本県臨床薬学フォーラム: 特別講演 (2003年5月、熊本)
- 5) Horiba, N., Masuda, S., Takeuchi, D., Okuda, M., Inui, K. cDNA cloning and functional characteristics of a novel Na⁺-dependent glucose transporter NaGLT1 in rat kidney. World Congress of Nephrology 2003 (June 2003, Germany)

6) Motohashi, H., Sakurai, Y., Ueo, H., Masuda, S., Okuda, M., Saito, H., Fukatsu, A., Ogawa, O., Doi, T., Inui, K. Expression levels of organic anion transporters and their correlation with urinary excretion of anionic drugs in patients with renal disease. World Congress of Nephrology 2003 (June 2003, Germany)

7) Horiba, N., Masuda, S., Takeuchi, A., Ohnishi C., Okuda, M., Inui, K. Identification of a novel low-affinity Na⁺-dependent glucose /fructose transporter NaGLT1. PharmaConferece 2003 (August 2003, Switzerland)

8) Horiba, N., Masuda, S., Takeuchi, A., Takeuchi, D., Okuda, M., Inui, K. A novel glucose transporter NaGLT1 mediates low-affinity Na⁺-dependent uptake of fructose as well as glucose in rat kidney. American Society of Nephrology (November 2003, USA)

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

10) 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)

11) 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)

12) 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)

13) 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.)

14) 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.)

15) 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.)

16) 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.)

17) 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

1) ヒト腎臓に発現する有機カチオントランスポータ hOCT2-A とその遺伝子 (特開: 2003-250576) 平成14年3月4日出願

2) グルコーストランスポータ NaGLT1 及びその遺伝子 (特願: 2002-363014) 平成14年12月13日出願

3) 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との相関について2年間にわたり114症例の腎疾患患者について検討した。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。腎機能低下患者の腎組織ではhOAT1遺伝子の発現量が1/10以下に低下していること、またhOAT3及びhOCT2などにも減少傾向が認められた。一方、hOAT2やhOAT4などでは有意差は認められなかった。これらの結果により、腎障害時において各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。またhOAT3発現量と抗生剤セファゾリン及びPSPの腎排泄との間に有意な正の相関が認められ、hOAT3発現量がアニオン性薬物の腎排泄を規定する一要因となる可能性が考えられた。しかし、相関係数は0.54と低くより精度の高い予測系を構築するためにはその他の影響因子について検討する必要がある。年齢、性別、肝機能などの基礎情報並びに生化学的検査値について検討したが、いずれも予測精度の向上に寄与しなかった。一方、確定診断をもとに分類し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と、hOAT3発現量とセファゾリン消失速度との間の相関関係が顕著に改善された。従って、薬物腎排泄に及ぼすトランスポータ発現量の影響は原疾患によって異な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並びに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。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。

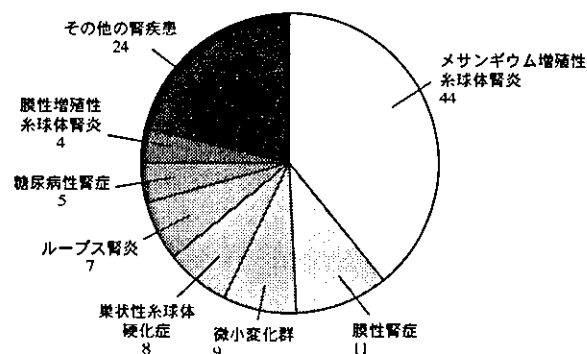
C. 研究成果

1) 腎疾患患者における薬物トランスポータの発現変動

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タ 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、腎近位尿細管側底膜に発現する hOAT1 の発現量が、正常腎皮質と比較して 1/10 以下に低下していることが明らかとなった。また hOAT3 や hOCT2 の発現量も低下していたが、hOAT2 の発現量には有意差が認められず、腎障害時において、薬物トランスポータが異なった発現挙動を示すと考えられた。

2) 腎疾患患者における薬物体内動態の変動

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は従来投与量の調節に用いられてきたクレアチニンクリアランスよりも、PSP 試験値と高い相関を示した。クレアチニンクリアランスは糸球体濾過速度と hOCT2 を介したカチオン輸送系が関与すると推察される。一方、PSP とセファゾリンは有機アニオン輸送系によって 90%以上が尿細管分泌される。従って、セファゾリン腎排泄の変動にはアニオン輸送系を介した尿細管分泌の寄与が大きいため、クレアチニンクリアランスが必ずしも良好な指標とならない。さらに、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タ発現量との比較解析を行



った。その結果、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タ発現量との間には相関が認められなかった。

hOAT3 発現量とセファゾリン消失速度との間に有意な相関が認められたものの、相関係数は高くなくさらに精度の高い予測法の構築が望まれる。そこで 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、体重などの基礎情報や肝機能検査値などの生化学的検査値などをパラメータとして組み入れ、重解析などによって再解析を行ったが顕著な相関係数の改善は認められなかった。次に疾患別の分類を行った。114 症例のうち、最も多かったメサンギウム増殖性糸球体腎炎と診断された患者は全体の 38%をしめる。メサンギウム増殖性糸球体腎炎の患者群(Group 1)では、その他の疾患群(Group 2)と比較してセファゾリン消失速度定数やクレアチニンクリアランス、有機イオントランスポータ発現量に有意な差は認められなかった。また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 試験値との相関も同程度であった。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。

3) 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仮定した。これら 5 名を外れ値と仮定することで相関係数は 0.54 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ところ、

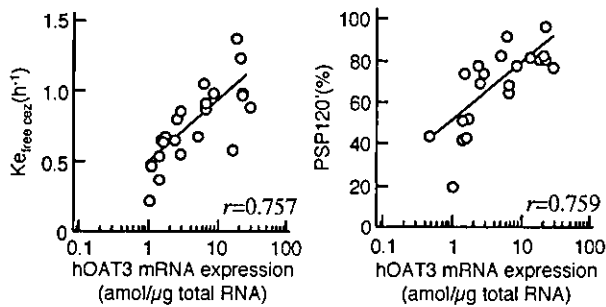


Fig. 2 メサンギウム増殖性糸球体腎炎患者における hOAT3 mRNA 量とセファゾリン消失速度定数ならびに PSP 試験値との相関

nonsynonymous 変異(A913T)が1カ所見出された。この変異は hOAT3 輸送活性に影響を及ぼすことが主任研究者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、従って、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。平成15年度までの研究において、トランスポータ発現量が薬物腎排泄速度の規定因子となる可能性が示されたものの、相関係数は低く個別化投与設計法のためにはさらに精度の高い予測系を構築する必要がある。これまでは全ての腎機能低下患者を1群として解析を続けてきたが、多様な病態を示す各腎疾患による影響を考慮する必要があっ

た。一次性腎疾患のうち最も患者数の多いメサンギウム増殖性糸球体腎炎の患者群で hOAT3 mRNA 発現量と PSP 試験値や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。このことは少なくともメサンギウム増殖性糸球体腎炎患者では hOAT3 発現量がアニオン性薬物の腎排泄速度を規定することを示唆している。特に尿細管分泌が腎排泄に及ぼす影響の大きい薬物では原疾患などを考慮することによってトランスポータ発現量に基づいた、薬物動態予測系を構築し得ることが示唆された。

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

現時点では特にない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagai, K., Arai, H., Yanagita, M., Matsubara, T., Kanamori, H., Nakano, T., Iehara, N., Fukatsu, A., Kita, T., Doi, T.: Growth arrest-specific gene 6 is involved in glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy. *J Biol Chem.* **278**(20), 18229-18234 (2003)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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 (MHN-01) on glucose and lipid metabolism in male Sprague-

Dawley rats after short- and long-term ingestion. *Metabolism*. **53**, 977-83 (2004)

5) 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)

6) 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, Arai H, Yanagita M, Matsubara T, Mima A, Kanamori H, Sumi E, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T Growth arrest-specific gene 6 plays an important role in the development of glomerular hypertrophy in the early phase of diabetic nephropathy. World Congress of Nephrology 2003 (June 2003, Germany)

2) Nagai K, Arai H, Yanagita M, Matsubara T, Mima A, Kanamori H, Sumi E, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T Role of growth arrest-specific gene 6 in glomerular hypertrophy in the early phase of diabetic nephropathy. American Diabetes Association, 63rd Scientific Sessions (June 2003, USA)

3) Abe H, Matsubara T, Iehara N, Nagai K, Takahashi T, Arai H, Kita T, Doi T Smad1 transcriptionally regulates type IV collagen expression, correlates with ALK1 in diabetic nephropathy. American Society of Nephrology (November 2003, USA)

4) Shono A, Tsukaguchi H, Yaoita E, Nameta M, Yamamoto T, Doi T An adhesion molecule coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) is a novel binding partner of podocin: implication of podocin in formation and maintenance of the cell-cell junction. American Society of Nephrology (November 2003, USA)

5) Nagai K, Arai H, Matsubara T, Mima A, Sumi E, Kanamori H, Yanagita M, Iehara N, Fukatsu A,

Kita T, Doi T Akt/mTOR-Mediated mesangial hypertrophy is important in the development of diabetic nephropathy. American Society of Nephrology (November 2003, USA)

6) Kitamura A, Tsukaguchi H, Kagami S, Hattori M, Ikeda M, Honda M, Nozu K, Yoshikawa N, Kuroda Y, Doi T, Iijima K Genetic linkage analysis of candidate loci in Japanese families with steroid resistant nephrotic syndrome. American Society of Nephrology (November 2003, USA)

7) Kawahara K, Minakuchi J, Kawashima S, Tsukaguchi H, Doi T, Matsumoto T. Is (1-84) PTH assay better than intact PTH assay as an indicator of the bone turnover condition in patients under maintenance hemodialysis? American Society of Nephrology (November 2003, USA)

8) 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.)

9) 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.)

10) 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.)

11) 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.)

12) 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.)

13) 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.)

14) 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.)

15) 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.)

16) 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。しかし間質の繊維化や尿細管の高度な萎縮にともなって、トランスポータ発現が減弱または消失していた。さらにトランスポータタンパクの局在変動と、腎薬物排泄能との相関について検討したところ、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、腎有機カチオン排泄は hOCT2 タンパク発現の低下にともなって減少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。トランスポータ発現について蛍光強度ならびに局在について検討した。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

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14-118ml/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。しかし、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タンパク質の発現が認められ、各トランスポートタンパク質の発現強度（蛍光シグナルの強度）は正常と比較して差は認められなかった。一方、高度に萎縮の進んだ一部の尿細管では、萎縮していない尿細管と比較して蛍光強度の減弱が認められた(Fig. 1)。さらに、繊維化の進んだ間質では何れのトランスポートの発現も認められなかった。

次に各トランスポートタンパク質の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ト 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。(Fig. 2)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

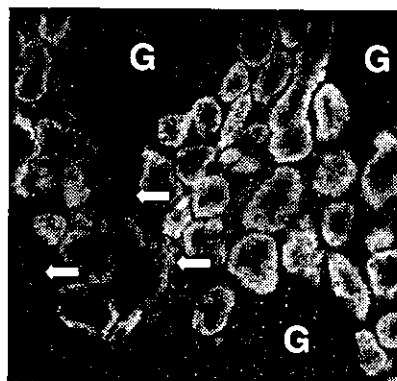


Fig. 1 膜性腎症患者における hOAT1 タンパクの発現
(G : 糸球体、←萎縮した尿細管)

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 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。本年度はまず各病理標本について組織障害の進展度を4段階に分けて評価した。トランスポート遺伝子発現変動解析において hOAT1 が腎疾患時に低下することを示している。また hOAT3 遺伝子発現量も減少傾向が認められている。慢性障害の指標である尿細管萎縮や間質の繊維化にともなって hOAT1 や hOAT3 mRNA 発現量に低下傾向が認められた。また、各トランスポートタンパク質の発現について局在と強度を4段階に分類したところ、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。これは高度に萎縮した尿細管や繊維化した間質にはトランスポートの発現が認められなかったことと対応する。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

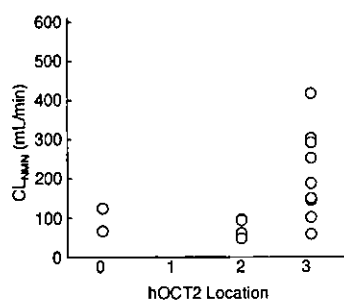


Fig. 1 hOCT2 localization と NMN クリアランス

の輸送系も関与するがその分子実体は不明である。今後、刷子緑膜のカチオン輸送体が明確になることによって腎有機カチオン排泄の変動の全容解明が期待される。

本研究対象とした患者の中に、PSP 試験値やセファゾリンの消失速度定数が低いものの、hOAT1 や hOAT3 タンパク質が正常と同程度発現している症例を認めている。hOAT1 及び hOAT3 はいずれも尿細管上皮細胞の側底膜側に存在するものであり、頂側膜側トランスポータの発現についても検討する必要があると考える。両細胞膜に発現するトランスポータ群が病腎組織においてどのような発現バランスをとるのかを解明することによって、腎疾患時における薬物の腎蓄積について有用な知見が得られると考える。

E. 結論

腎における薬物トランスポータは疾患や病態の進展度により発現分布に変化が生じていることが示唆された。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。薬物トランスポータ遺伝子発現量の変動に加えトランスポータタンパク質の発現並びに局在の変動を明らかにすることは、腎疾患時における薬物トランスポータ群の発現変動を明らかにし、薬物腎排泄との関連を明らかにする上で重要な情報である。

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) 深津敦司、家原典之 腎機能障害患者の薬物投与 臨床医 29(8), 1568-1570 (2003)

2) 深津敦司、田中芳徳 薬剤による水、電解質異常 Medicina 40(11), 1829-32 (2003)

3) 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) Nomura, K., Ono, T., Kobayashi, I., Liu, N., Nogaki, F., Arai, H., Fukatsu, A., Kita, T.: Role of factor Xa and effects of its inhibitor in mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. American Society of Nephrology (November 2003, USA)

2) 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