

200500227A

厚生労働科学研究研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

薬物の毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の
推定と毒性回避を指向したスクリーニング系の開発

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉山 雄一

平成18（2006）年3月

目 次

I. 総括研究報告	
薬物トランスポーターの分子多様性と機能解析および副作用発現との連鎖解析 杉山雄一	1
II. 分担研究報告	
1. 薬物の効果・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の <i>in vitro</i> 実験系 からの推定と、毒性回避のための <i>in vitro</i> スクリーニング系の開発 杉山雄一	8
2. 薬効・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の推定のための臨床研究 家入一郎	15
3. 薬剤代謝・トランスポーター遺伝子の SNP 解析キットの開発 徳永勝士	17
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	20
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

薬物の毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の推定と毒性回避を指向したスクリーニング系の開発

主任研究者 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・教授

研究要旨 本年度は、薬物動態の支配因子に焦点を当て、in vitro 新規実験系の開発ならびに個々の分子の薬物動態全体に与える相対的な重要性を明らかにする方法論の確立、さらには臨床研究の企画・着手ならびに SNPs タイピング法の開発を進めた。(1)薬物の肝取り込みにおける OATP1B1, OATP1B3、胆汁排泄過程における MDR1, MRP2, BCRP の寄与率の推定を試み、薬物によりその寄与が異なることを明らかにした。(2) 各種 PPAR agonist のトランスポーター阻害能の検討及び rat in vivo における血清胆汁酸上昇との関連を検討した。(3) pitavastatin における OATP1B1, BCRP 遺伝子多型の影響、pravastatin の高脂血症改善効果とトランスポーター・薬効関連遺伝子との間の関連について検討する臨床研究を行った。(4) 薬物代謝・トランスポーターに関わる SNPs を高速・低コストで解析できるキットの開発を進めた。これらの検討を通じて、薬物の薬効・副作用発現に関わる遺伝子群を定量的に同定する方法論の開発、臨床研究による実証、そして SNPs の迅速タイピングシステムの開発と、基礎の in vitro 実験での検討から臨床応用につなげるための研究を進めることができた。

分担研究者

家入一郎（九州大学大学院薬学研究院・助教授）

徳永勝士（東京大学大学院医学系研究科・教授）

A.研究目的

薬物の効果の個人差や副作用を引き起こすヒトの遺伝的要因について、遺伝子ノックアウト動物や遺伝子発現細胞などを用いて、特定の薬物動態・薬効・副作用に関係する分子が毒性に与える影響を定量的に観察することで、毒性関連候補遺伝子を推測する。上記実験の結果に基づき、遺伝子多型との関連を探る臨床研究を行い、さらに候補 SNPs を迅速に診断できるチップの開発を行うことで、臨床医療に成果を還元できるように検証実験を行う。

B.研究方法

(1) 有機アニオン性薬物の肝取り込み、胆汁排泄に関わる個々の分子の相対的な寄与率の解明

肝取り込みに関しては、OATP1B1, OATP1B3発現HEK293細胞ならびにヒト凍結肝細胞を用いて、3通りの寄与率の評価

法（選択的基質を用いる方法、選択的阻害剤を用いる方法、直接抗体で発現量を比較する方法）を併用してOATP1B1, OATP1B3の相対的な寄与率を見積もった。胆汁排泄については、遺伝子欠損動物(Mrp2欠損ラット(EHBR)ならびにMdr1(-/-), Bcrp(-/-)マウス)を用いて、定常状態における薬物の血中動態を調べることで、さらに、ヒト取り込み・排泄両トランスポーターを極性細胞に発現させた共発現系OATP1B1/MRP2, OATP1B1/MDR1, OATP1B1/BCRP発現細胞における薬物の経細胞輸送を観察した。

(2) PPAR α , PPAR γ , PPAR α/γ dual agonistsのトランスポーター阻害能の検討及びrat in vivoにおける血清胆汁酸上昇との関連研究

In vitro実験では、有機アニオンの取り込みトランスポーター(OATP1B1, OATP1B3, NTCP)発現HEK293細胞ならびに排泄トランスポーター(MRP2, BCRP, BSEP)を発現する細胞より調製した膜ベシクルを用いて、それぞれの典型的基質の輸送に対する薬物の阻害定数を算出した。テスト薬物としては、PPAR α agonistとして、gemfibrozil, clofibrate, bezafibrate, fenofibrate、PPAR γ agonistとして、troglitazone, troglitazone sulfate, pioglitazone, rosiglitazone、PPAR α/γ

dual agonistとして、tesaglitazar, muraglitazar, LM4156を用いた。In vivo実験では、PPAR γ agonist (troglitazone, pioglitazone, rosiglitazone)それぞれをラットに静脈内投与後、経時的に血液をサンプリングし、血清中総胆汁酸、taurocholate濃度を定量し、投与前の濃度との比較を行うとともに、血中の薬物濃度(troglitazoneについては、親化合物及び硫酸抱合体)を定量した。さらに、投与60分後に動物より肝臓を摘出し、肝臓内の薬物の濃度を定量した。

(3) 薬効・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の推定のための臨床研究

3-1. Pitavastatin study. OATP1B1(OATP-C)およびBCRP遺伝子多型で層別した健常成人を対象とした。ターゲット遺伝子型を有するボランティアにpitavastatinを単回投与し、体内動態と遺伝子型との関連を評価した。

3-2. Pravastatin study. Pravastatinを長期に服用する患者を対象とした。OATP-C、CYP7A1、ApoE遺伝子型と服用後のコレステロール値変動との関連を長期に渡って評価した。

(4) 薬物代謝・トランスポーター遺伝子のSNP解析キットの開発

DigiTag法と呼ばれる、DCNs (DNA coded numbers) を用いた新規SNP検査法を開発し、28箇所のSNP部位をマルチプレックスPCRによりゲノムDNAから切り出し、そのPCR産物を用いて28 SNPマルチプレックスタイピングを行った。

(倫理面への配慮)

本実験で用いたヒト肝細胞は、外国にて書面によるinformed consentに基づき採取されたものを販売会社(In vitro technologies, Inc. ならびにResearch Institute for Liver Disease)を通じて購入して使用している。

臨床試験は、臨床試験専門の医療施設に依頼して行った。被検者のプライバシーの確保とともに、保険制度、経済的な支援を確保するとともに、実施にあたっては、当該施設の倫理審査委員会ならびに、ゲノム審査委員会での審査、承認の後に実施した。遺伝子解析に使用したDNAは連結不可能匿名化された試料であり、本研究の目的等、倫理指針に準拠した説明を行い、書面による承諾を得た後に使用した。さらに、総ての研究は鳥取大学医学部倫理審査委員会および九州大学医学部倫理審査委員会においても、審査・承認を受けた後実施した。

またSNPタイピング研究は、すでにヒト

ゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会より承認を得た疾患関連遺伝子多型解析研究に含まれる。また本研究は技術開発研究であり、技術の評価に用いるヒトゲノム試料は、全て公的財団(ヒューマンサイエンス財団)より得た連結不可能匿名化済み試料である。

C.研究結果

(1) 有機アニオン性薬物の肝取り込み、胆汁排泄に関わる個々の分子の相対的な寄与率の解明

H1-antagonistであるfexofenadine、angiotensin II receptor拮抗薬であるtelmisartanは、共にOATP1B3により主に肝取り込みされることを明らかにした。さらに同種のangiotensin II receptor拮抗薬であるvalsartanは、OATP1B1、OATP1B3両方が同程度肝取り込みに関与することが明らかとなり、同じ薬効群の薬物であっても、その肝取り込みの分子メカニズム、相対的な重要性は異なることが示唆された。

また、HMG-CoA還元酵素阻害薬pitavastatinについて、Mrp2欠損ラット(EHBR)で胆汁排泄の遅延は見られず、Mdr1(-/-)マウスを用いての検討でも胆汁排泄の差は見られなかった。一方で、Bcrp(-/-)マウスを用いた検討では、pitavastatinの胆汁排泄がほぼ消失する結果を得た。一方で、pravastatinは、過去にEHBRにおいて胆汁排泄の著しい遅延が認められており、Bcrp(-/-)マウスでは、対照マウスと比較して胆汁排泄速度に変化が見られないことが確認された。さらに、ヒト共発現細胞3種類(OATP1B1/MDR1、OATP1B1/MRP2、OATP1B1/BCRP)を用いた経細胞輸送実験の結果、pravastatinは、OATP1B1/MRP2共発現細胞において最も大きな経細胞輸送が観察され多野に対して、pitavastatinは、すべての共発現細胞でほぼ同程度の経細胞輸送が観察された。

(2) PPAR α 、PPAR γ 、PPAR α/γ dual agonistsのトランスポーター阻害能の検討及びrat in vivoにおける血清胆汁酸上昇との関連研究

In vitro実験において、取り込みトランスポーター(OATP1B1、OATP1B3、NTCP)の発現細胞、ならびに、排泄トランスポーター(BSEP、BCRP、MRP2)の発現細胞より調製した膜ベシクルにおける典型的な基質の輸送に対する各種薬物の阻害能を検討した

ところ、全体的な傾向として、どのトランスポーターに対しても、PPAR γ agonistの阻害能が最も強く、ついで、PPAR α/γ dual agonist, PPAR α agonistの順であった。また、特にPPAR γ agonist 3種に焦点を当て、胆汁酸トランスポーターにより胆汁うっ滞の可能性に関する検討をin vitro, in vivoの両面から試みた。その結果、in vitro実験では、胆汁酸の排泄トランスポーターであるBSEPの阻害について、ラットBsepよりヒトBSEPに対する輸送阻害のほうが強い傾向が示された。胆汁酸の取り込みトランスポーターNTCPの取り込みに対するKi値を調べたところ、troglitazone sulfate が最も小さく、pioglitazone, rosiglitazoneは、低親和性の阻害しかかけなかった。一方、ratを用いて血清胆汁酸の上昇と薬物濃度の関係を観察したところ、troglitazone 投与後、troglitazone sulfateが肝臓内で濃縮的に存在した。一方で、pioglitazone, rosiglitazoneについては濃縮的な取り込みは見られなかった。血清中総胆汁酸ならびにtaurocholate濃度を観察したところ、総胆汁酸濃度では、troglitazoneで大きな上昇、pioglitazoneでも軽度の上昇が見られたのに対して、rosiglitazoneでは、上昇が見られなかったが、taurocholate濃度では、troglitazoneだけで上昇が見られた。

(3) 薬効・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の推定のための臨床研究

3-1. pitavastatin study. OATP1B1*15 変異あるいはBCRP 421C>Aを有することで、いずれもpitavastatin血中濃度の上昇が観察された。
3-2. pravastatin study. コレステロール低下作用と遺伝子多型との関連を評価した結果、Pravastatin服用初期である16週においては、OATP1B1*15 変異保有者で血中コレステロール低下作用が弱い傾向にあった(-14.1% vs -28.9%)。一方、1年間のモニター終了時においては、遺伝子型間での血中コレステロール低下作用に差は見られなかった。そこで、コレステロール動態に関与する遺伝子、CYP7A1とApoEについて関連を評価したところ、1年間の長期服用環境下においては、CYP7A1の-204Cのホモ接合体、CYP7A1-204C/ApoE e4のヘテロ接合体で血中コレステロール低下作用に弱い傾向を認めた(-24.3% vs -33.1%)。

(4) 薬物代謝・トランスポーター遺伝子のSNP解析キットの開発

28箇所のSNPsを対象としたマルチプレックスSNPタイピングを40検体で行った。その結果、多型が見られなかったSNP#13とクラスター分離の悪かった3箇所のSNPs(#6, #9, #19)を除く全24SNPsにおいてコール率は99.2%となることが分かった。また、シーケンシング結果との一致率は100%となり、2回の独立した実験から再現性は、2箇所のSNPsを除いて、R二乗値で0.99以上となることが分かった(SNP#2: 0.96, SNP#20: 0.96)。次に、ミスマッチを導入した5'クエリープローブを用いると、SNP#6とSNP#9においてクラスター分離が改善されSNPタイピングに成功することが明らかとなった。この結果、ミスマッチ導入プローブを用いた際のタイピング成功率は96.3%となることが分かった。

D. 考察

(1) 有機アニオン性薬物の肝取り込み、胆汁排泄に関わる個々の分子の相対的な寄与率の解明

これまで有機アニオンの肝取り込みにはOATP1B1が、基質選択性の広範さなどから最も重要であろうと考えられてきた。しかしながら、肝臓には他にも、OATP1B3のように、OATP1B1に遺伝的・機能的に類似するトランスポーターがあることが知られており、本研究で、OATP1B1, OATP1B3の相対的な寄与は薬物により異なり、薬物動態の予測のためには、1B1, 1B3両方の機能を考慮する必要があることを明確にした。さらに、同じ薬効群に属する薬物で、共に肝集積性は高い薬物の肝取り込み機構が、薬物により異なることは、あるトランスポーターの機能・発現変化が誘起された場合に、薬物動態に与える変化が薬物により異なることを意味しており、非常に興味深いと考えている。今後、この寄与の変化が、薬物動態の変化にもたらす影響の違いについて、臨床研究を通じて実証していきたいと考えている。さらに、胆汁排泄トランスポーターについても、同効薬であるにも関わらず寄与が異なる可能性があることを動物実験で示した。一方、pravastatinについては、ヒトトランスポーター共発現系から得られたデータと動物実験の結果に関連性が伺えるが、pitavastatinでは、MDR1, MRP2, BCRPに同程度輸送されることから、今後、胆汁排泄過程の寄与率の種差を検討する必要がある。

あると考えられる。

(2) PPAR α , PPAR γ , PPAR α/γ dual agonists のトランスポーター阻害能の検討及びrat in vivoにおける血清胆汁酸上昇との関連研究

有機アニオントランスポーター複数種に対して、典型的な基質の輸送に対する阻害能を比較したところ、PPAR γ agonist でどのトランスポーターに対しても比較的強い阻害能が見られた。従って、薬効の母核が、有機アニオントランスポーターの阻害に関わる部分と共通の構造を有している可能性が考えられ、薬効でトランスポーターの阻害能が決定される可能性があることが示唆された。臨床血中濃度から考えると、今回見られた阻害の程度では、一部の例を除いては、薬物間相互作用などにつながるような阻害にはいたらないであろうことが定量的に推測された。一方で、胆汁酸の取り込み・排泄に関わるトランスポーターである NTCP, BSEP については、NTCP, BSEP については、troglitazone sulfate による阻害は、臨床でも起こりうるが見積もられた。一方で、pioglitazone については、ラットでは阻害が起こりえない肝臓内濃度であったが、BSEP の阻害強度に大きな種差が見出されたことから、ヒトでは、阻害が起こりうる可能性が考えられ、今後臨床における検討が必要であると思われた。

(3) 薬効・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の推定のための臨床研究

pitavastatin の肝輸送には、取り込み時に OATP1B1 が、胆汁排出時には BCRP の関与が強く示唆された。いずれの変異保有者においても、血中濃度上昇が認められているがメカニズムが異なることから、前者では、血中コレステロール低下作用の減弱が、後者では、高濃度暴露による肝障害への関与などが予想される。HMG-CoA 還元酵素阻害剤の適正使用には、この影響を明らかとしていく必要がある。また、pravastatin による血中コレステロール低下作用への OATP1B1 多型の関与を検討したところ、投与開始初期に影響し、長期間投与では影響しないことが示唆された。長期投与では、CYP7A1 や ApoE といった脂質代謝に関与するタンパクの関与が強くなるところが興味深い。従って、HMG-CoA 還元酵素阻害剤の適正使用には、服用する時期に応じたターゲット遺伝子が存在することが示唆さ

れた。

(4) 薬物代謝・トランスポーター遺伝子の SNP 解析キットの開発

DigiTag 法では、解析対象となる SNP の対立遺伝子型を DCNs へと変換してから解析を行う。物理化学的性質が一樣となるように設計された DCNs を用いて解析を行うことにより、SNP タイピングを正確にかつ高い再現性で行えることが明らかとなった。また、エンコード反応に用いる 5'クエリープローブにミスマッチを導入することにより、より高い成功率で SNP タイピングを行えることが分かった。

DigiTag 法の特徴のひとつとして汎用性の高さが挙げられる。解析対象となる SNPs に対して自由に DCNs を割り当てられることから、エンコード反応以降は共通の素材および実験条件で解析を行うことができる。これらの特徴は本手法がより安価な遺伝情報解析のプラットフォームとなりうることを示している。

E. 結論

以上の検討より、肝取り込みトランスポーター・胆汁排泄トランスポーターの相対的な寄与率には差があること、胆汁排泄トランスポーターの阻害定数と in vivo における臨床血中濃度を考察することで、その薬物が胆汁排泄トランスポーターを阻害して胆汁うっ滞を引き起こす可能性を予測しうるということが明らかとなった。

また、医薬品の肝輸送には、取り込み過程と排出過程を考慮する必要性をヒトデータにより初めて明らかとした。

さらに、DigiTag 法と名付けた新たなマルチプレックス SNP タイピング法を開発し、高い成功率で SNP を迅速に判定できる方法論の基礎が完成した。今後、薬剤代謝や薬剤トランスポートに関わる遺伝子群の機能的多型をタイピングできるキット開発につながる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hirano, M., Maeda, K., Hayashi, H., Kusahara, H. and Sugiyama, Y. Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile

- acid substrate, pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 876-82 (2005).
- 2) Hirano, M., Maeda, K., Matsushima, S., Nozaki, Y., Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol Pharmacol* 68: 800-7 (2005).
- 3) Hirono, S., Nakagome, I., Imai, R., Maeda, K., Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Estimation of the three-dimensional pharmacophore of ligands for rat multidrug-resistance-associated protein 2 using ligand-based drug design techniques. *Pharm Res* 22: 260-9 (2005).
- 4) Hirouchi, M., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. Treatment of Hyperbilirubinemia in Eisai Hyperbilirubinemic Rat by Transfecting Human MRP2/ABCC2 Gene. *Pharm Res* 22: 661-6 (2005).
- 5) Matsushima, S., Maeda, K., Kondo, C., Hirano, M., Sasaki, M., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. Identification of the Hepatic Efflux Transporters of Organic Anions Using Double-Transfected Madin-Darby Canine Kidney II Cells Expressing Human Organic Anion-Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1)/Multidrug Resistance-Associated Protein 2, OATP1B1/Multidrug Resistance 1, and OATP1B1/Breast Cancer Resistance Protein. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 1059-67 (2005).
- 6) Mita, S., Suzuki, H., Akita, H., Hayashi, H., Onuki, R., Hofmann, A. F. and Sugiyama, Y. Vectorial transport of unconjugated and conjugated bile salts by monolayers of LLC-PK1 doubly transfected with human NTCP and BSEP or with rat Ntcp and Bsep. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290: G550-6 (2006)
- 7) Shimizu, M., Fuse, K., Okudaira, K., Nishigaki, R., Maeda, K., Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Contribution of oatp (organic anion-transporting polypeptide) family transporters to the hepatic uptake of fexofenadine in humans. *Drug Metab Dispos* 33: 1477-81 (2005).
- 8) Hayashi, H., Takada, T., Suzuki, H., Akita, H. and Sugiyama, Y. Two common PFIC2 mutations are associated with the impaired membrane trafficking of BSEP/ABCB11. *Hepatology* 41: 916-24 (2005).
- 9) Hayashi, H., Takada, T., Suzuki, H., Onuki, R., Hofmann, A. F. and Sugiyama, Y. Transport by vesicles of glycine- and taurine-conjugated bile salts and taurothiocholate 3-sulfate: a comparison of human BSEP with rat Bsep. *Biochim Biophys Acta*, 1738: 54-62 (2005)
- 10) 前田和哉, 杉山雄一, IV. がん治療の最前線と今後の展望 7. テーラーメイド治療、2)抗がん剤の効果・副作用に関連する薬剤代謝酵素・トランスポーターの遺伝子多型性、「臨床腫瘍内科学入門」、金倉 譲編 永井書店 pp.130-137 (2005)
- 11) 前田和哉, 杉山雄一、解毒・排出系の遺伝子多型、「予防医学事典」、松島綱治、酒井敏行、石川昌、稲寺秀邦編 朝倉書店 pp.220-222 (2005)
- 12) 家入一郎、トランスポーターの遺伝子多型と臨床、臨床化学、vol.34, 5-10, 2005
- 13) 家入一郎、薬物トランスポーターと薬剤感受性(1)-薬物トランスポーター遺伝子多型の臨床的意義-、最新医学、vol.60, 1827-1832, 2005
- 14) Nishida N, Tanabe T, Hashido K, Hirayasu K, Takasu M, Suyama A and Tokunaga K: DigiTag assay for multiplex SNP typing with high success rate. *Anal. Biochem.* 346(2): 281-288, 2005.
- 15) Bannai M, and Tokunaga K: Single nucleotide polymorphism typing using degenerate-oligonucleotide-primed PCR-amplified products. In: *Whole Genome Amplification*. (Ed. S. Hughes and R. Lasken) Scion Publishing Ltd.: 11-21, 2005.

2. 学会発表

- 1) Sugiyama Y, "Assessment of Transcellular Transport of New Drug Candidates to Predict their Hepatobiliary and Renal Clearances", North Jersey Drug Metabolism, 2005.4, East Hanover, USA
- 2) Sugiyama Y, "The impact of OATP transporters and their polymorphism on pharmacokinetics", 3rd World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery, 2005.4, Barcelona, Spain
- 3) 前田和哉、平野雅、石黒直樹、五十嵐隆、Thomas Ebner、Willy Roth、設楽悦久、杉山雄一、ヒト肝細胞を用いた薬物の肝取り込みに関与する トランスポーターの寄与率

- の解明 ～ピタバスタチンとテルミサルタンを例にとって～、HAB 研究機構学術年会、2005.5、東京
- 4) Maeda, K, Ieiri, I, Yasuda, K, Fujino, A, Fujiwara, H, Otsubo, K, Hiroyuki Kusuhara, H and Sugiyama, Y, IMPACT OF OATP1B1 (OATP-C/OATP2)*1b HAPLOTYPE ON THE PHARMACOKINETICS OF PRAVASTATIN, VALSARTAN AND TEMOCAPRIL IN JAPANESE SUBJECTS, 5th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, 2005.5, Hakone
- 5) 前田和哉, 家入一郎, 保田国伸, 藤野明治, 藤原博明, 大坪健司, 楠原洋之, 杉山雄一、肝取り込みトランスポーター OATP1B1*1b 変異が pravastatin, valsartan, temocapril の体内動態に与える影響、第13回肝病態生理研究会、2005.6、大阪
- 6) 林久允, 高田龍平, 秋田英万, 鈴木洋史, 杉山雄一、ヒト Bile salt export pump (BSEP) 変異体を用いた進行性家族性胆汁うっ滞症 2型(PFIC2)発症機構の解析、第13回肝病態生理研究会、2005.6、大阪
- 7) 平野雅, 前田和哉, 松島総一郎, 野崎芳胤, 設楽悦久, 楠原洋之, 杉山雄一、新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬ピタバスタチンの胆汁排泄メカニズムの解析 ～BCRP の関与～、第13回肝病態生理研究会、2005.6、大阪
- 8) 北村吏司, 前田和哉, 杉山雄一、新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬ロスバスタチンの肝輸送過程を決定するトランスポーターの解析、第13回肝病態生理研究会、2005.6、大阪
- 9) Sugiyama Y, “Variability in Drug Transporters”, 2005 European ISSX Meeting, 2005.6
- 10) Maeda, K and Sugiyama, Y., The determination of the contribution of several transporters to the overall hepatic uptake and efflux clearance in humans, Meeting of the European Hepatobiliary Transport Group, 2005.8, St. Gallen, Switzerland
- 11) Maeda, K., Hirano, M., Matsushima, S., Nozaki, Y., Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Breast cancer resistance protein (BCRP) is responsible for the biliary excretion of pitavastatin in mice. 4th International Research Conference on Biomedical Transporters 2005, 2005.8, St. Gallen, Switzerland
- 12) Sugiyama Y, “Prediction of Transporter-Based Drug Interactions”, BioMedical Transporters 2005, 2005.8, St. Gallen, Switzerland
- 13) Ishiguro, N, Maeda, K, Ebner, T, Roth, W, Igarashi, T and Sugiyama, Y., Involvement of OATP1B3 in the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, 13th North-American ISSX/20th JSSX joint meeting, 2005.10, Maui, Hawaii
- 14) Sugiyama Y, “Drug Transporters: Roles in New Drug Discovery and Development”, 13th NA ISSX Meeting/20th JSSX Meeting, 2005.10, Maui, Hawaii
- 15) Kitamura, S, Maeda, K and Sugiyama, Y. Involvement of transporters in the hepatic transport of rosuvastatin, 13th North-American ISSX/20th JSSX joint meeting, 2005.10, Maui, Hawaii
- 16) 前田和哉, 田迎, 杉山雄一、PPAR γ agonist による胆汁酸トランスポーター阻害能および in vivo 胆汁うっ滞に関する検討、第27回胆汁酸研究会、2005.10、弘前
- 17) 前田和哉, 平野雅, 石黒直樹, 北村吏司, 山城わかば, 松島総一郎, 杉山雄一、ヒトにおける薬物の肝取り込み、排泄に関わるトランスポーターの多様性、寄与率の評価、第27回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2005.11、京都
- 18) 榎園淳一, 楠原洋之, 杉山雄一、マウスの小腸と大腸における Breast cancer resistance protein (BCRP)の発現分布および機能解析、第27回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2005.11、京都
- 19) 山縣哲雄, 楠原洋之, 森下真莉子, 高山幸三, 杉山雄一、医薬品添加物による消化管異物排泄トランスポーターへの影響、第27回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2005.11、京都
- 20) 前田和哉, 平野雅, 石黒直樹, 北村吏司, 山城わかば, 松島総一郎, 杉山雄一、ヒト肝臓における薬物の異物解毒能予測のための in vitro トランスポーター実験系の確立:ヒト凍結肝細胞・double transfectants の活用、第19回日本動物実験代替法学会年会、2005.12、神奈川
- 21) 前田和哉, 落合隆文, 小沢直記, 濱義昌, 上田敏之, 阿部由貴子, 菅原紀子, 松井一, 滝克彦, 伊藤清美, 楠原洋之, 杉山雄一、創薬を指向した薬物トランスポーター情報統

合データベース TP-search の構築、日本薬剤学会第 21 年会、2006.3、金沢

22) 渡辺悦郎, 楠原洋之, 杉山雄一、哺乳類発現系を用いた organic solute transporter alpha-beta の機能解析、日本薬剤学会第 21 年会、2006.3、金沢

23) 平松万里子, 前田和哉, 杉山雄一、細胞系における共存化合物による排出トランスポーター MRP2(multidrug resistance associated protein 2)の輸送機能促進効果に関する検討、日本薬剤学会第 21 年会、2006.3、金沢

24) 広内幹和, 楠原洋之, 大貫玲子, Borst P, 杉山雄一、MRP3 を介した肝臓中から循環血中への排泄寄与の解析、日本薬剤学会第 21 年会、2006.3、金沢

25) 慈磊, 楠原洋之, Adachi M, Schuetz JD, 杉山雄一、Functional analysis of MRP4 on the urinary excretion of cephalosporin antibiotics、日本薬剤学会第 21 年会、2006.3、金沢

26) 田迎, 前田和哉, 杉山雄一、Analysis of the inhibitory effect of PPAR agonists on transporter-mediated uptake and efflux in the liver and its in vivo relevance、日本薬剤学会第 21 年会、2006.3、金沢

27) 前田和哉, 杉山雄一、トランスポーターの遺伝子多型が臨床薬物動態に与える影響および *in vitro* 実験系からの予測法、日本薬学会第126年会、2006.3、仙台

28) Ieiri I, Multiple gene polymorphisms, Asian symposium for pharmaceutical Science in JSPS, 2006, Fukuoka,

29) Ieiri, I, Interactive session - Warfarin pharmacogenomics, The first FIP-APSTJ joint workshop on individualized medicine, 2006, Tokyo

30) 西田奈央、田邊哲也、金子善興、高須美和、陶山 明、徳永勝士：新規マルチプレックス SNP タイピング法の開発、日本人類遺伝学会第 50 回大会プログラム・抄録集、p133, 2005.9.20. 倉敷

31) Nishida N, Tanabe T, Takasu M, Kaneko Y, and Tokunaga K: A newly developed multiplex SNP typing method, DigiTag assay. The American Society of Human Genetics 55th Annual Meeting Abstracts p255, 2005.10.26-28. Salt Lake City.

32) 西田奈央、田邊哲也、金子善興、高須美和、陶山 明、徳永勝士：DigiTag 法によるマルチプレックス SNP タイピング、第 28

回日本分子生物学会年会プログラム、p302、2005.12.9. 福岡

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

標的核酸を検出又は定量する方法（特願 2004-296784）

厚生科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

薬物の効果・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の *in vitro* 実験系からの推定と、毒性回避のための *in vitro* スクリーニング系の開発

主任研究者 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・教授

研究要旨 本年度は、薬物動態の支配因子に焦点を当て、*in vitro* 新規実験系の開発ならびに個々の分子の薬物動態全体に与える相対的な重要性を明らかにする方法論の確立及び種々の薬物を用いた以下の検討を行った。(1) 臨床で汎用される薬物の肝取り込みにおける OATP1B1, OATP1B3 の寄与率の推定を試みた。その結果、肝臓に集積する同効薬同士においても、OATP1B1, OATP1B3 の相対的な重要性が薬物により異なることを明らかにした。(2) pitavastatin の胆汁排泄機構の解明を遺伝子欠損動物を用いて行った。その結果、他の HMG-CoA 還元酵素阻害薬である pravastatin とは異なり、Bcrp ノックアウトマウスを用いた検討で胆汁排泄がほぼ消失したことから、pitavastatin の胆汁排泄には、少なくともげっ歯類では Bcrp が重要であることを示した。(3) PPAR α , PPAR γ , PPAR α/γ dual agonists のトランスポーター阻害能の検討及び rat *in vivo* における血清胆汁酸上昇との関連研究を行った。PPAR γ agonist は、他のカテゴリーの薬物群と比較して、多くの有機アニオンの取り込み・排泄トランスポーターを比較的強く阻害する傾向が見られた。さらに、胆汁酸の排泄トランスポーターである BSEP の阻害能力には、大きな種差が見られることが明らかとなった。また、ラットに troglitazone を投与後、troglitazone sulfate が肝臓内に高濃度で集積し、血清総胆汁酸・血清中 taurocholate 濃度が上昇することが明らかとなった。他の PPAR γ agonist では、そのような現象は見られなかった。

A.研究目的

薬物の毒性発現の決定要因のひとつに、薬物動態学的な側面が挙げられる。従って、薬物が、副作用臓器に集積したり、何らかの原因で、消失機構が阻害されたりするなどして、血中濃度が予期せぬ上昇をするなどすることによる副作用が考えられる。これらを推定するためには、汎用されている薬物が、どのような分子により薬物動態が制御されており、それらの相対的な重要性を決めることが重要であると考えられる。本研究では、*in vitro* 実験系を用いて、薬物動態に関与する複数の分子を同定しうるスクリーニング系の開発ならびにそれらを用いた臨床で汎用されている薬剤の評価を試みた。

B.研究方法

(1) 有機アニオン性薬物の肝取り込みにおける OATP1B1, OATP1B3 の相対的な寄与率の解明

OATP1B1, OATP1B3 発現 HEK293 細胞を

用いて、評価したい薬物の取り込み能力を測定した。併せてヒト凍結肝細胞を用いて、遊離肝細胞の状態、薬物と一定時間 incubation することで、薬物の肝細胞への経時的な取り込みを観察した。寄与率の評価については、以下の3通りの方法の場合により併用した。

- a. トランスポーター選択的基質 (estrone-3-sulfate (E-sul) (OATP1B1), cholecystokinin octapeptide (CCK-8) (OATP1B3) の輸送能力をヒト肝細胞と発現系で比較して、相対的な輸送能力の比を計算し、その比を、試験薬物のそれぞれの発現系における取り込みの値に乗じて計算する方法
- b. トランスポーター選択的阻害剤 (E-sul (OATP1B1)) を用いて、肝細胞における試験薬物の取り込みの阻害程度から見積もる方法
- c. トランスポーターの抗体を用いて、それぞれのヒト肝細胞・発現系における相対的な発現量をバンド濃度比より計

算して見積もる方法。

(2) 遺伝子欠損動物・トランスポーター遺伝子共発現系を用いたpitavastatinの胆汁排泄機構の解明 (pravastatinとの比較)

遺伝子欠損動物(Mrp2欠損ラット(EHBR)ならびにMdr1(-/-), Bcrp(-/-)マウス)を用いた検討では、胆管カニューレを施した動物に薬物を一定時間infusionして、血中濃度が定常状態になるような条件下における、定常状態血中濃度と胆汁排泄速度から、胆汁排泄クリアランスの算出を行った。さらに、ヒト取り込み・排泄両トランスポーターを極性細胞に発現させた共発現系OATP1B1/MRP2, OATP1B1/MDR1, OATP1B1/BCRP発現細胞をそれぞれ、transwell上に培養して単層膜を形成させ、薬物の経細胞輸送を観察した。

(3) PPAR α , PPAR γ , PPAR α/γ dual agonistsのトランスポーター阻害能の検討及びrat in vivoにおける血清胆汁酸上昇との関連研究

In vitro実験では、有機アニオンの取り込みトランスポーター(OATP1B1, OATP1B3, NTCP)発現HEK293細胞ならびに排泄トランスポーター(MRP2, BCRP, BSEP)を発現する細胞より調製した膜ベシクルを用いて、それぞれの典型的基質の輸送に対する薬物の阻害定数を算出した。テスト薬物としては、PPAR α agonistとして、gemfibrozil, clofibrate, bezafibrate, fenofibrate、PPAR γ agonistとして、troglitazone, troglitazone sulfate, pioglitazone, rosiglitazone、PPAR α/γ dual agonistとして、tesaglitazar, muraglitazar, LM4156を用いた。In vivo実験では、PPAR γ agonist (troglitazone, pioglitazone, rosiglitazone)それぞれをラットに静脈内投与後、経時的に血液をサンプリングし、血清中総胆汁酸濃度を酵素法のキットを用いて、血清中taurocholate濃度をLC/MSを用いてそれぞれ定量し、投与前の濃度との比較を行うとともに、血中の薬物濃度(troglitazoneについては、親化合物及び硫酸抱合体)を定量した。さらに、投与60分後に動物より肝臓を摘出し、肝臓内の薬物の濃度をLC/MSを用いて定量した。

(倫理面への配慮)

本実験で用いたヒト肝細胞は、外国にて書面によるinformed consentに基づき採取されたものを販売会社(In vitro technologies, Inc. ならびにResearch Institute for Liver Disease)

を通じて購入して使用している。

C.研究結果

(1) 有機アニオン性薬物の肝取り込みにおけるOATP1B1, OATP1B3の相対的な寄与率の解明

H1-antagonistであるfexofenadineについては、発現系ではOATP1B3発現系では対照細胞と比較して有意な取り込みが見られたが、OATP1B1発現系では、対照細胞と比較して有意差がつかない程度の極めて小さな取り込みしか示さなかった。さらに、発現量の比からの推定から、少なくとも肝取り込みの半分以上は、OATP1B3によるものであることが見積もりにより明らかとなった。また、angiotensin II receptor拮抗薬である、telmisartan, valsartanについて同様の検討を進めた。その結果、valsartanは、選択的基質を用いた寄与率の推定法を用いて、OATP1B1, OATP1B3の肝取り込みにおける寄与はほぼ同等であることが分かったのに対し、telmisartanは、OATP1B3発現系でのみ取り込みが観察され、OATP1B1発現系では取り込みがまったく観察されなかった。さらに、ヒト肝細胞の取り込みにおいて、OATP1B1選択的阻害剤であるE-sulを用いて、阻害の程度を観察したところ、これまで既にほぼOATP1B1により肝取り込みされていることが明らかとなっているpitavastatinの肝取り込みは、E-sulによりほぼ完全に阻害されたのに対し、telmisartanの取り込みは、高濃度E-sul共存下においてもほぼ阻害されなかったことから、OATP1B3により肝取り込みされていることを支持する結果を得た。

(2) 遺伝子欠損動物・トランスポーター遺伝子共発現系を用いたpitavastatinの胆汁排泄機構の解明 (pravastatinとの比較)

まず、Mrp2欠損ラット(EHBR)と対照となるSDラットに、pitavastatinを血中濃度が定常状態になるまでinfusionし、血中濃度ならびに胆汁排泄速度を比較したところ、両ラット間でまったく差は見られなかった。Mdr1(-/-)マウスを用いて同様の検討を行ったが、コントロールマウス(FVB)との比較で差は見られなかった。一方で、Bcrp(-/-)マウスを用いた検討では、pitavastatinの胆汁排泄がほぼ消失する結果を得た。一方で、pravastatinは、過去にEHBRにおいて胆汁排泄の著しい遅延が認められており、今回、

Bcrp(-/-)マウスでは、対照マウスと比較して胆汁排泄速度に変化が見られないことが確認された。一方で、ヒト共発現細胞3種類 (OATP1B1/MDR1, OATP1B1/MRP2, OATP1B1/BCRP)を用いた経細胞輸送実験の結果、pravastatinは、OATP1B1/MRP2共発現細胞において最も大きなbasalからapical方向への経細胞輸送が観察された。一方で、pitavastatinは、すべての共発現細胞でほぼ同程度の経細胞輸送が観察された。

(3) PPAR α , PPAR γ , PPAR α/γ dual agonistsのトランスポーター阻害能の検討及びrat in vivoにおける血清胆汁酸上昇との関連研究

In vitro実験において、取り込みトランスポーター (OATP1B1, OATP1B3, NTCP) の発現細胞、ならびに、排泄トランスポーター (BSEP, BCRP, MRP2)の発現細胞より調製した膜ベシクルにおける典型的な基質の輸送に対する各種薬物の阻害能を検討したところ、全体的な傾向として、どのトランスポーターに対しても、PPAR γ agonistの阻害能が最も強く、ついで、PPAR α/γ dual agonist, PPAR α agonistの順であった。ただ、PPAR α agonistにおいても、bezafibrateのBCRP輸送に対する阻害($K_i=6.6 \mu\text{M}$)のようにトランスポーター選択的に強い阻害能を有する薬物も見られた。特に強い阻害を見せた troglitazone sulfateでは、NTCP, OATP1B1, OATP1B3に対して、それぞれ0.21, 0.014, 0.26 μM ときわめて低い阻害定数を示した。一方、特にPPAR γ agonist 3種に焦点を当て、胆汁酸トランスポーターにより胆汁うっ滞の可能性に関する検討をin vitro, in vivoの両面から試みた。その結果、in vitro実験では、胆汁酸の排泄トランスポーターであるBSEPの阻害についてヒト、ラット両方の遺伝子発現膜ベシクルを用いて検討を行ったところ、ラットBsepよりヒトBSEPに対する輸送阻害のほうが、強い傾向が示され、特にpioglitazoneでは、ラットBsepに対する K_i 値が100 μM 以上であるのに対して、ヒトBSEPに対する K_i 値は、0.1 μM 以下の値を示した。また、胆汁酸の取り込みトランスポーターNTCPの取り込みに対する K_i 値を調べたところ、troglitazone sulfate (0.21 μM) < troglitazone (11 μM) << pioglitazone, rosiglitazone (~50 μM)であることが分かった。一方、ratを用いてPPAR γ agonist 3種に焦点を当てた血清胆汁酸の上昇と薬物濃度の関係を観察したところ、 troglitazone

(10mg/kg) 投与後、troglitazone sulfateが肝臓内で生成され、その肝臓内濃度 (投与60分後) は、血中濃度の約10倍以上にも達していた。一方で、pioglitazone (10mg/kg)投与後は、親化合物の血中濃度は100 μM 程度と高く維持され、肝臓内濃度の血中濃度とほぼ同等の値を示した。Rosiglitazone (2mg/kg) 投与後は、血中濃度より肝臓内濃度が低い値を示した。さらに、血清中総胆汁酸ならびにtaurocholate濃度を見たところ、総胆汁酸濃度では、troglitazoneで大きな上昇、pioglitazoneでも軽度の上昇が見られたのに対して、rosiglitazoneでは、上昇が見られなかったが、taurocholate濃度では、troglitazoneだけで上昇が見られた。

D.考察

(1) 有機アニオン性薬物の肝取り込みにおけるOATP1B1, OATP1B3の相対的な寄与率の解明

これまで有機アニオンの肝取り込みにはOATP1B1が、基質選択性の広範さなどから最も重要であろうと考えられてきた。しかしながら、肝臓には、OATP1B3, OATP2B1など他のOATPファミリートランスポーターの発現が認められており、特にOATP1B3は、1B1同様、肝特異的な発現を示し、基質選択性も類似していることから重要であることが想定され、本研究を行うに至った。OATP2B1は、1B1, 1B3と比較して、肝臓のみならず消化管など他の臓器での発現が見られ、さらに基質選択性が若干狭いことが挙げられる。ヒト肝細胞及び発現系における発現量の比較による解析から、少なくとも当研究室が保有する発現系での取り込み活性が、1B1, 1B3発現系での取り込みクリアランスの10倍以上の値を示して初めて2B1が肝取り込みに重要であることがいえるということが見積もられ、未だそのような化合物は探索されていないことから、おそらく2B1の肝取り込みにおける寄与は全体的に小さいと考えてよいだろうと思われる結果を得ている。従って、主にOATP1B1, 1B3に焦点を絞った解析を以後行うこととした。その結果、fexofenadine, telmisartanなどOATP1B3に主に輸送されると考えられる化合物が発見されてきた。さらに、同じ薬効群に属する薬物で、共に肝集積性は高い薬物の肝取り込み機構が、薬物により異なることは、あるトランスポーターの機

能・発現変化が誘起された場合に、薬物動態に与える変化が薬物により異なることを意味しており、非常に興味深いと考えている。今後、この寄与の変化が、薬物動態の変化にもたらす影響の違いについて、臨床研究を通じて実証していきたいと考えている。例えば、OATP1B1については、機能変化を起こす変異が報告されているが、OATP1B3の機能変化を起こす変異は、*in vitro* レベルで報告されているが、頻度が極めて低いことが知られている。従って、OATP1B1の遺伝子多型との関連を探ることで、寄与率の違いをある程度評価することが可能となるかも知れないと考えられる。

(2) 遺伝子欠損動物・トランスポーター遺伝子共発現系を用いたpitavastatinの胆汁排泄機構の解明 (pravastatinとの比較)

本研究では、胆汁排泄トランスポーターが、同効薬であるにも関わらず異なる可能性があることを動物実験で示した例となる。一方で、pravastatinは、ヒトトランスポーターの共発現系におけるデータについても、OATP1B1/MRP2発現系における経細胞輸送が最も大きかったことから、*in vivo*においてMrp2の重要性が実証された事実と合致する。このことは、estradiol-17 β -glucuronideについても成り立つことから、MRP2の重要性がラットで示された基質は、ヒト共発現系においても、OATP1B1/MRP2で最も大きな経細胞輸送が見られるという共通点が見出せることが分かった。一方で、pitavastatinでは、すべての共発現系においてほぼ同様の経細胞輸送が観察されたことから、必ずしもノックアウトマウスの結果が、ヒトにおける胆汁排泄トランスポーターの寄与の推定に結びつくかについては、現時点で分からない。今後は、ヒトにおける胆汁排泄トランスポーターの寄与の推定法を考案すべく、複数の検討を試みている。また、併せてBCRPには、機能低下を引き起こす変異(Q141K)が、比較的高頻度で見られることから、遺伝子多型とpitavastatinの体内動態の関連を観察する臨床研究を行って、pitavastatinの体内動態におけるBCRPの重要性を明らかにしていきたいと考えている。

(3) PPAR α , PPAR γ , PPAR α/γ dual agonistsのトランスポーター阻害能の検討及びrat *in vivo*における血清胆汁酸上昇との関連研究

有機アニオントランスポーター複数種に対

して、典型的な基質の輸送に対する阻害能を比較したところ、PPAR γ agonistでどのトランスポーターに対しても比較的強い阻害能が見られた。従って、薬効の母核が、有機アニオントランスポーターの阻害に関わる部分と共通の構造を有している可能性が考えられ、薬効でトランスポーターの阻害能が決定される可能性があることが示唆された。臨床血中濃度から考えると、今回見られた阻害の程度では、一部の例を除いては、薬物間相互作用などにつながるような阻害にはいたらないであろうことが定量的に推測された。一方で、胆汁酸の取り込み・排泄に関わるトランスポーターであるNTCP, BSEPについては、PPAR γ agonistについて、臨床血中濃度でも阻害を起こしうる可能性が考えられる結果を得た。NTCPについては、troglitazone sulfateの臨床投与量での蛋白非結合型濃度は、NTCPに対するKi値とほぼ同等であることから、阻害を×可能性があることが示された。また、ratを用いた検討から、仮に血中/肝臓中濃度比がヒトでも同様であると仮定すると、troglitazone sulfateについては、Bsepの阻害定数の値との比較から、臨床で阻害が起こる可能性があることが示された。一方で、pioglitazoneについては、ラットでは阻害が起こりえない肝臓内濃度であったが、ヒトでは、阻害が起こりうる可能性が考えられ、今後臨床における検討が必要であると思われる。また、今回のような検討を通じ、*in vivo*における胆汁うっ滞能を*in vitro*実験系より予測しうるということが考えられた。そこで、ヒトNTCP/BSEP共発現系を作製し、胆汁酸の経細胞輸送に与える各種薬物の影響を観察することで、胆汁うっ滞能を予測できる可能性があり、今後検討を進める予定である。さらに、high throughputスクリーニングを視野にいれ、蛍光胆汁酸を使ったassay系の確立も行っていきたいと考えている。

E.結論

以上の検討より、肝取り込みトランスポーター・胆汁排泄トランスポーターの相対的な寄与率には差があることが示唆されるデータを得た。また、胆汁排泄トランスポーターの阻害定数と*in vivo*における臨床血中濃度を考察することで、その薬物が胆汁排泄トランスポーターを阻害して胆汁うっ滞を引き起こす可能性を予測しうるこ

明らかとなった。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

2. 論文発表

- 1) Hirano, M., Maeda, K., Hayashi, H., Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile acid substrate, pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 876-82 (2005).
- 2) Hirano, M., Maeda, K., Matsushima, S., Nozaki, Y., Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol Pharmacol* 68: 800-7 (2005).
- 3) Hirono, S., Nakagome, I., Imai, R., Maeda, K., Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Estimation of the three-dimensional pharmacophore of ligands for rat multidrug-resistance-associated protein 2 using ligand-based drug design techniques. *Pharm Res* 22: 260-9 (2005).
- 4) Hirouchi, M., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. Treatment of Hyperbilirubinemia in Eisai Hyperbilirubinemic Rat by Transfecting Human MRP2/ABCC2 Gene. *Pharm Res* 22: 661-6 (2005).
- 5) Matsushima, S., Maeda, K., Kondo, C., Hirano, M., Sasaki, M., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. Identification of the Hepatic Efflux Transporters of Organic Anions Using Double-Transfected Madin-Darby Canine Kidney II Cells Expressing Human Organic Anion-Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1)/Multidrug Resistance-Associated Protein 2, OATP1B1/Multidrug Resistance 1, and OATP1B1/Breast Cancer Resistance Protein. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 1059-67 (2005).
- 6) Mita, S., Suzuki, H., Akita, H., Hayashi, H., Onuki, R., Hofmann, A. F. and Sugiyama, Y. Vectorial transport of unconjugated and conjugated bile salts by monolayers of LLC-PK1 doubly transfected with human NTCP and BSEP or with rat Ntcp and Bsep. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* in press: (2005).
- 7) Shimizu, M., Fuse, K., Okudaira, K., Nishigaki, R., Maeda, K., Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Contribution of oatp (organic anion-transporting polypeptide) family transporters to the hepatic uptake of fexofenadine in humans. *Drug Metab Dispos* 33: 1477-81 (2005).
- 8) Hayashi, H., Takada, T., Suzuki, H., Akita, H. and Sugiyama, Y. Two common PFIC2 mutations are associated with the impaired membrane trafficking of BSEP/ABCB11. *Hepatology* 41: 916-24 (2005).
- 9) Hayashi, H., Takada, T., Suzuki, H., Onuki, R., Hofmann, A. F. and Sugiyama, Y. Transport by vesicles of glycine- and taurine-conjugated bile salts and taurothiocholate 3-sulfate: a comparison of human BSEP with rat Bsep. *Biochim Biophys Acta* in press, (2005).
- 10) 前田和哉, 杉山雄一, IV. がん治療の最前線と今後の展望 7. テーラーメイド治療、2)抗がん剤の効果・副作用に関連する薬剤代謝酵素・トランスポーターの遺伝子多型性、「臨床腫瘍内科学入門」, 金倉 謙編 永井書店 pp.130-137 (2005)
- 11) 前田和哉, 杉山雄一、解毒・排出系の遺伝子多型、「予防医学事典」, 松島綱治、酒井敏行、石川昌、稲寺秀邦編 朝倉書店 pp.220-222 (2005)

2. 学会発表

- 1) Sugiyama Y, "Assessment of Transcellular Transport of New Drug Candidates to Predict their Hepatobiliary and Renal Clearances", North Jersey Drug Metabolism, 2005.4, East Hanover, USA
- 2) Sugiyama Y, "The impact of OATP transporters and their polymorphism on pharmacokinetics", 3rd World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery, 2005.4, Barcelona, Spain
- 3) 前田和哉、平野雅、石黒直樹、五十嵐隆、Thomas Ebner、Willy Roth、設楽悦久、杉山雄一、ヒト肝細胞を用いた薬物の肝取り込みに関与する トランスポーターの寄与率の解明 ～ピタバスタチンとテルミサルタンを例にとって～、HAB 研究機構学術年会、2005.5、東京
- 4) Maeda, K, Ieiri, I, Yasuda, K, Fujino, A, Fujiwara, H, Otsubo, K, Hiroyuki Kusuhara, H and Sugiyama, Y, IMPACT OF OATP1B1 (OATP-C/OATP2)*1b HAPLOTYPE ON

- THE PHARMACOKINETICS OF PRAVASTATIN, VALSARTAN AND TEMOCAPRIL IN JAPANESE SUBJECTS, 5th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, 2005.5, Hakone
- 5) 前田和哉, 家入一郎, 保田国伸, 藤野明治, 藤原博明, 大坪健司, 楠原洋之, 杉山雄一、肝取り込みトランスポーター OATP1B1*1b 変異が pravastatin, valsartan, temocapril の体内動態に与える影響、第 13 回肝病態生理研究会、2005.6、大阪
- 6) 林久允, 高田龍平, 秋田英万, 鈴木洋史, 杉山雄一、ヒト Bile salt export pump (BSEP) 変異体を用いた進行性家族性胆汁うっ滞症 2 型(PFIC2)発症機構の解析、第 13 回肝病態生理研究会、2005.6、大阪
- 7) 平野雅, 前田和哉, 松島総一郎, 野崎芳胤, 設楽悦久, 楠原洋之, 杉山雄一、新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬ピタバスタチンの胆汁排泄メカニズムの解析 ~BCRP の関与~、第 13 回肝病態生理研究会、2005.6、大阪
- 8) 北村吏司, 前田和哉, 杉山雄一、新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬ロスバスタチンの肝輸送過程を決定するトランスポーターの解析、第 13 回肝病態生理研究会、2005.6、大阪
- 9) Sugiyama Y, "Variability in Drug Transporters", 2005 European ISSX Meeting, 2005.6
- 10) Maeda, K and Sugiyama, Y., The determination of the contribution of several transporters to the overall hepatic uptake and efflux clearance in humans, Meeting of the European Hepatobiliary Transport Group, 2005.8, St. Gallen, Switzerland
- 11) Maeda, K., Hirano, M., Matsushima, S., Nozaki, Y., Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Breast cancer resistance protein (BCRP) is responsible for the biliary excretion of pitavastatin in mice. 4th International Research Conference on Biomedical Transporters 2005, 2005.8, St. Gallen, Switzerland
- 12) Sugiyama Y, "Prediction of Transporter-Based Drug Interactions", BioMedical Transporters 2005, 2005.8, St. Gallen, Switzerland
- 13) Ishiguro, N, Maeda, K, Ebner, T, Roth, W, Igarashi, T and Sugiyama, Y., Involvement of OATP1B3 in the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, 13th North-American ISSX/20th JSSX joint meeting, 2005.10, Maui, Hawaii
- 14) Sugiyama Y, "Drug Transporters: Roles in New Drug Discovery and Development", 13th NA ISSX Meeting/20th JSSX Meeting, 2005.10, Maui, Hawaii
- 15) Kitamura, S, Maeda, K and Sugiyama, Y. Involvement of transporters in the hepatic transport of rosuvastatin, 13th North-American ISSX/20th JSSX joint meeting, 2005.10, Maui, Hawaii
- 16) 前田和哉, 田迎, 杉山雄一、PPAR γ agonist による胆汁酸トランスポーター阻害能および in vivo 胆汁うっ滞に関する検討、第 27 回胆汁酸研究会、2005.10、弘前
- 17) 前田和哉, 平野雅, 石黒直樹, 北村吏司, 山城わかば, 松島総一郎, 杉山雄一、ヒトにおける薬物の肝取り込み、排泄に関わるトランスポーターの多様性、寄与率の評価、第 27 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2005.11、京都
- 18) 榎園淳一, 楠原洋之, 杉山雄一、マウスの小腸と大腸における Breast cancer resistance protein (BCRP) の発現分布および機能解析、第 27 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2005.11、京都
- 19) 山縣哲雄, 楠原洋之, 森下真莉子, 高山幸三, 杉山雄一、医薬品添加物による消化管異物排泄トランスポーターへの影響、第 27 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2005.11、京都
- 20) 前田和哉, 平野雅, 石黒直樹, 北村吏司, 山城わかば, 松島総一郎, 杉山雄一、ヒト肝臓における薬物の異物解毒能予測のための in vitro トランスポーター実験系の確立: ヒト凍結肝細胞・double transfectants の活用、第 19 回日本動物実験代替法学会年会、2005.12、神奈川
- 21) 前田和哉, 落合隆文, 小沢直記, 濱義昌, 上田敏之, 阿部由貴子, 菅原紀子, 松井一, 滝克彦, 伊藤清美, 楠原洋之, 杉山雄一、創薬を指向した薬物トランスポーター情報統合データベース TP-search の構築、日本薬剤学会第 21 年会、2006.3、金沢
- 22) 渡辺悦郎, 楠原洋之, 杉山雄一、哺乳類発現系を用いた organic solute transporter alpha-beta の機能解析、日本薬剤学会第 21 年会、2006.3、金沢
- 23) 平松万里子, 前田和哉, 杉山雄一、細胞

系における共存化合物による排出トランスポーター MRP2(multidrug resistance associated protein 2)の輸送機能促進効果に関する検討、日本薬剤学会第21年会、2006.3、金沢

24) 広内幹和, 楠原洋之, 大貫玲子, Borst P, 杉山雄一、MRP3 を介した肝臓中から循環血中への排泄寄与の解析、日本薬剤学会第21年会、2006.3、金沢

25) 慈磊, 楠原洋之, Adachi M, Schuetz JD, 杉山雄一、Functional analysis of MRP4 on the urinary excretion of cephalosporin antibiotics、日本薬剤学会第21年会、2006.3、金沢

26) 田迎, 前田和哉, 杉山雄一、Analysis of the inhibitory effect of PPAR agonists on transporter-mediated uptake and efflux in the liver and its in vivo relevance、日本薬剤学会第21年会、2006.3、金沢

27) 前田和哉, 杉山雄一、トランスポーターの遺伝子多型が臨床薬物動態に与える影響および *in vitro* 実験系からの予測法、日本薬学会第126年会、2006.3、仙台

H.知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究要旨 本年度は HMG-CoA 還元酵素阻害剤である、(1) pitavastatin と (2) pravastatin を取りあげ、(1)では、OATP-C 及び BCRP 遺伝子多型を考慮した臨床試験を実施することで、取り込みと排出に関与する薬物トランスポーターの同時機能評価を試みた。また、(2)では、肝取り込みの低下を伴う OATP-C 遺伝子多型とその他の効果に関する遺伝子変異も含めた遺伝情報と pravastatin による高脂血症改善効果との関連を評価した。(1); Pitavastatin を始めとするスタチンの適正使用法の確立と両トランスポーターのヒト生体中での生理的役割を明らかにすることを目的とした。その結果、OATP-C*15 あるいは BCRP421C>A 変異を有することで、pitavastatin の血中濃度は上昇傾向を示した。両変異が肝輸送能の低下を伴うことが強く示唆された。現在、本結果の精度を高めるための対象被検者を増やした臨床試験を再度実施中である。(2); 高脂血症改善効果は、OATP-C 遺伝子多型の影響を受け、OATP-C*15 を有することで効果の減弱が観察された。しかし、この効果の差は、投与後初期に見られる現象であり、長期服用においては、遺伝子変異の有無はリスクファクターではないことが示唆された。OATP-C*15 変異が輸送能を欠損する変異ではなく、減弱の原因変異であることが背景と思われる。

A.研究目的

薬物トランスポーター遺伝子多型と基質薬物の体内動態との関連を評価することで、生体中での機能を明らかにし、副作用を含む薬効に見られる大きな個人差の原因を解明し、医薬品開発や適正使用の基盤とする。

B.研究方法

(1). Pitavastatin study. OATP-C および BCRP 遺伝子多型で層別した健常成人を対象とした。ターゲット遺伝子型を有するボランティアに pitavastatin を単回投与し、体内動態と遺伝子型との関連を評価した。

(2) Pravastatin study. Pravastatin を長期に服用する患者を対象とした。OATP-C、CYP7A1、ApoE 遺伝子型と服用後のコレステロール値変動との関連を長期に渡って評価した。

（倫理面への配慮）

臨床試験は、臨床試験専門の医療施設に依頼して行った。被検者のプライバシーの確保とともに、保険制度、経済的な支援を確保するとともに、実施にあたっては、当該施設の倫理審査委員会ならびに、ゲノム審査委員会での審査、承認の後に実施した。遺伝子解析に使用した DNA は連結不可能匿名化された試料であり、本研究の目的等、

倫理指針に準拠した説明を行い、書面による承諾を得た後に使用した。さらに、総ての研究は鳥取大学医学部倫理審査委員会および九州大学医学部倫理審査委員会においても、審査・承認を受けた後実施した。

C.研究結果

(1) pitavastatin study. OATP-C と BCRP 遺伝子多型と体内動態との関連では、OATP-C*15 変異あるいは BCRP 421C>A を有することで、いずれも pitavastatin 血中濃度の上昇が観察された。しかし、両変異のいずれかをホモ接合体で有する被検者は日本人では少なく、精度を上げるためには、被検者の増員が必要なことから、現在、2 次目の臨床試験を行っている。(2) pravastatin study. コレステロール低下作用と遺伝子多型との関連を評価した結果、Pravastatin 服用初期である 16 週においては、OATP-C*15 変異保有者で血中コレステロール低下作用が弱い傾向にあった(-14.1% vs -28.9%)。一方、1 年間のモニター終了時には、遺伝子型間での血中コレステロール低下作用に差は見られなかった。そこで、コレステロール動態に関与する遺伝子として、CYP7A1 と ApoE に注目し、関連

を評価した。その結果、1年間の長期服用環境下においては、CYP7A1の-204Cのホモ接合型、CYP7A1-204C/ApoE e4のヘテロ接合体で血中コレステロール低下作用に弱い傾向を認めた(-24.3% vs -33.1%)。

D. 考察

最終的な結論を得るには至っていないが、pitavastatinの肝輸送には、取り込み時にOATP-Cが、胆汁排出時にはBCRPの関与が強く示唆された。本検討は、薬物の肝輸送を取り込みと排出に分け、両過程を同時に評価した初めての研究である。いずれの遺伝子にも機能に影響する多型の存在が示唆された；いずれの変異保有者においても、血中濃度上昇が認められた。しかし、その機序はまったく異なり、取り込み阻害と排泄阻害となる。前者では、血中コレステロール低下作用の減弱が、後者では、高濃度暴露による肝障害への関与などが予想される。HMG-CoA還元酵素阻害剤の適正使用には、この影響を明らかとしていく必要がある。そこで、pravastatinによる血中コレステロール低下作用へのOATP-C多型の関与を検討した。その結果、OATP-C*15の関与は、投与開始、比較的初期に影響し、長期間投与では影響しないことが示唆された。*15変異は輸送能を欠損するものではなく、弱いながらも有していることがその原因と考えられる。長期投与では、CYP7A1やApoEといった脂質代謝に関与するタンパクの関与が強くなるのが興味深い。従って、HMG-CoA還元酵素阻害剤の適正使用には、服用する時期に応じたターゲット遺伝子が存在することが示唆された。

E. 結論

医薬品の肝輸送には、取り込み過程と排出過程を考慮する必要性をヒトデータにより初めて明らかとした。創薬、適正使用に展開することが必要である。

F. 健康危険情報

特にないが、疾患や医薬品効果の個人差解明に関する知見が得られた。

G. 研究発表

3. 論文発表

- 1) 家入一郎、トランスポーターの遺伝子多型と臨床、臨床化学、vol. 34, 5-10, 2005
- 2) 家入一郎、薬物トランスポーターと薬剤感受性(1)-薬物トランスポーター遺伝子多型の臨床的意義-、最新医学、vol. 60, 1827-1832, 2005

2. 学会発表

- 1) Ieiri I, Multiple gene polymorphisms, Asian symposium for pharmaceutical Science in JSPS, 2006, Fukuoka,
- 2) Ieiri, I, Interactive session - Warfarin pharmacogenomics, The first FIP-APSTJ joint workshop on individualized medicine, 2006, Tokyo

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在までに、出願、登録はない。

研究要旨：薬剤代謝や薬剤トランスポートに関わる遺伝子群の機能的 SNP を高い信頼度で簡便・低コストに解析できるキットの開発が望まれている。本研究では、これら薬剤応答性遺伝子の機能的 SNP を同時並列的に検査できる技術を開発することを目指す。平成 17 年度は DigiTag 法と名付けた新たなマルチプレックス SNP タイピング法を開発し、28 種の SNPs の同時タイピングを試みたところ、96% (26/27) という高い成功率が達成され、またシーケンシング結果との一致率も 100% と有望な技術であることがわかった。

A.研究目的

薬剤応答性の個人差は、薬理メカニズムに存在する機能的多型の他、薬剤代謝に関わる遺伝子群および薬剤トランスポーター遺伝子群に存在する機能的 SNP による血中濃度時間推移の個人差が大きく関わっている。これら薬剤応答性遺伝子群の機能的 SNP と各種薬剤への応答性の個人差との関連を明らかにし、医療の場において使いやすい SNP タイピングキットを開発することは、期待される個人化医療の実現のために必要不可欠な要素である。本研究においては、既知および新規の薬剤応答性遺伝子の機能的 SNP の全てを同時並列的に検査（マルチプレックスタイピング）できる技術を開発し、キットとして実用化することを目指す。

B.研究方法

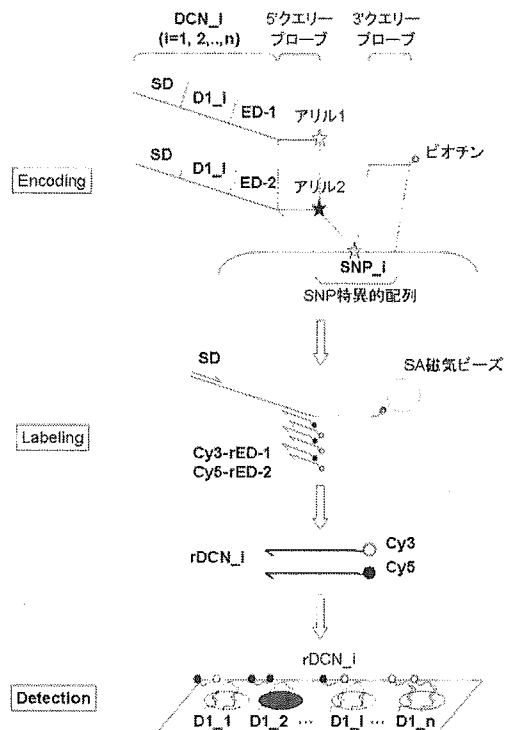
DigiTag 法の概要

DigiTag 法では、SNP の対立遺伝子型は DCNs (DNA coded numbers) と呼ばれるオリゴ DNA へと一対一に変換される。DCNs は物理的、化学的に性質が一樣となるように設計したオリゴ DNA のことで、DCNs を使うことで正確な DNA 分子反応を並列的に行うことが可能となる。DCNs は 3つの部分配列（名称：SD、D1、ED）で構成されている。SD、ED はすべての DCNs に共通な配列で PCR を行う際にプライミング部位として使用する。D1 は各 DCNs に特異的な配列とし、DCNs の種類を識別するために用いる。SNP 情報から DCNs への変換反応（エンコード反応）は

ライゲーション反応で行い、複数の SNP 部位から同時に SNP 情報を DCNs へ変換することができる。変換された SNP 情報は共通のプライマーペアで一様に増幅し、DNA キャピラリーアレイを用いてすべての DCNs の読み出しを行うことで対立遺伝子型が決定される（図 1）。

エンコード反応では、解析対象となる SNP ごとに 2種類の 5'クエリープローブと 1種類の 3'クエリープローブを用意する。

図 1. DigiTag 法の概要図



5'クエリープローブはSNP特異的配列の5'側と相補的な配列を持つアリルに特異的なプローブである。また、5'クエリープローブには、アリルに対応した2種類のED(ED-1、ED-2)を持つDCNが付加されている。3'クエリープローブはSNP特異的配列の3'側と相補的な配列を持つSNPに特異的なプローブである。また、3'クエリープローブの5'末端にはリン酸基、3'末端にはビオチンが付加されている。SNPを含むSNP特異的配列上で、5'クエリープローブと3'クエリープローブが隣接してハイブリダイゼーションしたときにライゲースにより2つのプローブが連結される。ライゲーション産物をストレプトアビジンコートされた磁気ビーズで回収することにより、アリルに対応したDCNだけを回収することができる(図1)。

DigiTag法によるマルチプレックスSNPタイプピング

28箇所のSNP部位をマルチプレックスPCRによりゲノムDNAから切り出し、そのPCR産物を用いて28SNPマルチプレックスタイプピングを行った。マルチプレックスPCRは以下のように行った。全量20 µlの反応溶液(QIAGEN Multiplex PCR Kit, QIAGEN)に各SNP部位特異的なプライマーペアを0.5 pmolを加え、さらにゲノムDNAを5 ngと2×QIAGEN Multiplex PCR master mixを10 µl加えた。また、反応条件は95 °C15分の熱変性後、95 °C30秒、68 °C6分を1サイクルとして40サイクル行った。続いて、エンコード反応は以下のように行った。全量30 µlのライゲーション反応溶液(*Taq* DNA ligase, NEB)に28箇所のSNPsに対応する5'クエリープローブと3'クエリープローブを10 fmolずつ加え、さらにマルチプレックスPCR産物を1 µlと20 Uの酵素を加えた。また、反応条件ははじめに95 °C5分、続いて58 °C15分とした。エンコード反応後に磁気ビーズ(Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynal)を用いてライゲーション産物を回収した後、SD、rEDプライマーを用いてアシンメトリックPCRを行った。PCR反応溶液は全量20 µlとし、1 pmolのSDプライマー、10 pmolのCy3修飾rED-1プライマーとCy5修飾rED-2プライマーを加え、さらに2.5 Uの酵素(*Ex Taq* polymerase, TaKaRa)を加えた。また、反応条件は95 °C1分の熱変性後、95 °C30秒、

55 °C30秒、72 °C30秒を1サイクルとして20サイクル行った。最後に蛍光導入されたPCR産物を回収し、DNAキャピラリーアレイ(オリンパス)へのハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション溶液は0.5×SSC、0.1% SDS、15%ホルムアミド、1 mM EDTAとし、90 °C1分の熱変性後、ハイブリオープンで37 °C、30分間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの結果はDNAチップスキャナー(GenePix4000A, Axon Instruments)を用いて画像データとして読み取り、画像解析ソフトにより数値データの解析を行った。

ミスマッチ導入プローブの検討

ミスマッチ導入プローブは、5'クエリープローブのSNP塩基から上流4塩基目をほかの塩基に置き換えて用意した。SNP#6およびSNP#9に対応する5'クエリープローブをミスマッチ導入プローブに変えてマルチプレックスSNPタイプピングを行った。各反応溶液の組成および反応条件は前述と同じとした。

研究倫理面への配慮

本研究は、すでにヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会より承認を得た疾患関連遺伝子多型解析研究に含まれる。また本研究は技術開発研究であり、技術の評価に用いるヒトゲノム試料は、全て公的財団(ヒューマンサイエンス財団)より得た連結不可能匿名化済み試料である。

C.研究結果

DigiTag法によるマルチプレックスSNPタイプピング

28箇所のSNPsを対象としたマルチプレックスSNPタイプピングを40検体で行った。その結果、多型が見られなかったSNP#13とクラスター分離の悪かった3箇所のSNPs(#6、#9、#19)を除く全24SNPsにおいてコール率は99.2%となることが分かった。また、シーケンシング結果との一致率は100%となり、2回の独立した実験から再現性は、2箇所のSNPsを除いて、R二乗値で0.99以上となることが分かった(SNP#2: 0.96、SNP#20: 0.96)。解析した27SNPsのうち、24箇所のSNPsでは3つの明瞭なクラスターが観察され、SNPタイプピングに成功していることが分かった(タイプピング成功率88.8%)。しかし、SNP#6、