

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

ゲノム情報を活用した薬物トランスポータ  
発現量予測システムの構築とテーラーメイド薬物療法への応用

(課題番号 H17-ファーマコ-002)

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 乾 賢一

分担研究者 山岡 義生

分担研究者 小川 修

平成 18 (2006) 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告		
ゲノム情報を活用した薬物トランスポータ発現量予測 システムの構築とテーラーメイド薬物療法への応用	—————	1
II. 分担研究報告		
1. 肝臓がんに対する摘除術の施行と肝薬物トランスポータの発現・遺伝子多型解析 山岡 義生	—————	11
2. 腎臓がんに対する摘除術の施行とゲノム情報と臨床データの相関解析 小川 修	—————	17
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	24
IV. 研究成果の刊行物・別刷	—————	26

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
総括研究報告書

ゲノム情報を活用した薬物トランスポータ  
発現量予測システムの構築とテーラーメイド薬物療法への応用

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
	上井 優一	京都大学医学部附属病院薬剤部・助手

【研究要旨】

近年、薬物トランスポータ発現量の個体差が、臨床効果の変動因子として重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。しかし、種々薬物トランスポータの発現制御機構並びに発現量の個体差を規定する因子については不明の点が多い。そこで、本研究では、(1) ヒト消化管における薬物トランスポータの発現解析、(2) 薬物トランスポータのプロモーター解析、(3) 薬物トランスポータの輸送解析について検討し、上述した問題点解決のための基礎情報の収集に努めた。検討した主な薬物トランスポータは、ペプチドトランスポータ (PEPT)、有機カチオントランスポータ (OCT) 及び有機アニオントランスポータ (OAT) である。

ヒト消化管（食道～直腸）において、種々薬物トランスポータの mRNA 発現量を定量した。PEPT1 は小腸において最も高く発現し、部位別の発現量は十二指腸>空腸>回腸であった。また腸上皮化生に伴い、PEPT1 が胃にも発現することがわかった。薬物排出ポンプ MDR1 の小腸における発現分布は、十二指腸<空腸<回腸であった。さらに大腸（結腸<直腸）においても、十二指腸や空腸と同程度の発現量を示した。有機イオントランスポータ群 (OCT1-3、OCTN1-2、OAT1-4、URAT1) では、OCTN2 を除いて、消化管全域においてほとんど発現が認められなかった。カルニチンを生理的基質とする OCTN2 は、胃から直腸まで高い発現量を示した。

PEPT1 の基礎転写には、基礎転写因子 Sp1 の関与していることが明らかになった。また PEPT1 の小腸における発現は、小腸特異的な転写因子 Cdx2 によって制御されていることがわかった。Cdx2 は Sp1 と相互作用して、PEPT1 の転写を調節していることが判明した。また、ヒトの胃組織（腸上皮化生の検体を含む）における PEPT1 と Cdx2 の mRNA 発現量は良好な相関を示し、*in vivo* においても Cdx2 の重要性が示された。OCT2 及び OAT3 のプロモーター解析を行ったところ、転写開始部位約 100 bp 上流に存在する CCAAT box を含む領域が、両トランスポータの基礎転写に重要であることが示唆された。

薬物トランスポータの新たな基質薬物の検索を行ったところ、OCT2 は抗がん剤シスプラチンやビグアナイド系糖尿病治療薬メトホルミンを輸送することがわかった。またアデホビルなど抗ウイルス薬は、主に OAT1 によって輸送されることが明らかになった。

これらの研究成果は、種々薬物トランスポータの発現に影響を及ぼすゲノム情報の抽出並びにそのテーラーメイド薬物療法への応用において、有用な基礎的知見になると考えられる。

#### 【分担研究者】

1. 山岡義生・田附興風会医学研究所 北野病院・病院長

2. 小川 修・京都大学医学部附属病院・教授

#### A. 研究目的

Pharmacogenomics 研究の進展により、薬効・薬物動態関連遺伝子の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) 情報に基づいた「個の医療」が現実味を帯びてきている。例えば薬物代謝酵素 CYP2C19 で代謝されるオメプラゾールを用いた *H. Pylori* 除菌療法において、血中濃度が初回投与時から高く維持される poor metabolizer で有効率が高いと報告され、薬物投与設計に CYP2C19 の cSNP (coding 領域の SNP) 情報を組み込む準備が進められている。一方、薬物動態個体間変動因子として想定されている薬物トランスポータにおいては、phenotype と相関する cSNP の報告は少なく、むしろ発現量の個体差が臨床効果の変動因子として重要な役割を果たしていることが、申請者等の臨床研究を中心に明らかになりつつある。しかし薬物トランスポータの発現制御に関わる転写領域の解析は、多くのトランスポータにおいて未着手の状態である。

発現量予測のための因子としては、プロモーター領域の SNP (regulatory SNP: rSNP) あるいはイントロン領域の SNP (intronic SNP: iSNP) が候補として想定される。例えば、抗癌剤イリノテカンの代謝に関わる UGT1A1 の遺伝子多型\*28 は、プロモーター領域の遺伝子多型であり、UGT1A1 の転写活性の低下と引き続き発現する UGT1A1 酵素量が減少し、副作用が起こりやすくなると考えられている。薬物トランスポータの場合には、薬物排出ポンプ P-糖タンパク質 (MDR1) の rSNP が大腸での MDR1 mRNA 発現量に影響を及ぼすことが報告されている。また、有機イオントランスポータファミリーに属する SLC22A4 (OCTN1) の iSNP が OCTN1 の発現量に影響し、リウマチの危険因子になることや SLC22A5 (OCTN2) の rSNP が OCTN2 遺伝子の転写に影響し、クローン病発症のリスクに関与していることが報告されている。これらの研究は、rSNP や iSNP が薬物トランスポータの発現量に影響を及ぼすことを強く示唆するものであるが、いずれの研究も疾患との関連について注目したものであり、薬物動態個体間変

動因子として着目しているものではない。

本研究は、ゲノム情報を駆使することによって、薬物トランスポータの発現量を予測できる新システムを構築し、その臨床的有用性について明らかにすることを最終目標としている。初年度である今年度は、薬物トランスポータの発現プロファイルの作成、プロモーター解析、新規の基質薬物の検索を行い、上記目標を達成するための基礎情報の収集を試みた。

#### B. 研究方法

本年度は3年計画 (平成17年度～平成19年度) の初年度に当たり、(1) 消化管における薬物トランスポータの発現解析、(2) 薬物トランスポータのプロモーター解析、(3) 薬物トランスポータの輸送解析を行った。

##### 1) 消化管における薬物トランスポータの発現解析

消化器がん (食道がん、胃がん、大腸がん、膵臓がんなど) と診断され、摘出術を施行された患者から得られた消化管各組織 (食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、回腸、膵臓) の正常部より、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、各組織から粗膜画分を調製し、ペプチドトランスポータ (PEPT1) の immunoblotting を行った。さらに、胃の病理切片を用いて、抗 CD10 抗体による免疫組織染色を行った。

##### 2) 薬物トランスポータのプロモーター解析

PEPT1、有機アニオントランスポータ (OAT3)、有機カチオントランスポータ (OCT2) のプロモーター解析を実施した。各薬物トランスポータの転写開始部位は、5'-RACE 法により決定した。また各薬物トランスポータのプロモーター領域 (転写開始部位の上流約 3 kbp) は、human genomic DNA を鋳型として PCR により増幅し、pGL3-Basic ベクターにサブクローニングした。プロモーターの deletion construct は制限酵素処理により、また種々シスエレメントに変異を導入した変異体は市販キットを用いて作製した。転写活性は、各 construct を小腸 (Caco-2 細胞) あるいは腎臓 (OK 細胞、LLC-PK<sub>1</sub> 細胞) 由来の細胞に一過性に発現させ、ルシフェラーゼアッセイにより測定した。また転写因子のシスエレメントへの結合実験は、Gel Shift Assay 及びクロマチン免疫沈降法により行った。

##### 3) 薬物トランスポータの輸送解析

薬物トランスポータの新たな基質の検索を目的として、種々ヒト型薬物トランスポータ安定発現細胞

を用いて、薬物輸送実験を行った。対象薬物としては、抗がん剤（シスプラチン）、ピグアナイド系糖尿病治療薬（メトホルミン）並びに抗ウイルス薬（アデホビル、シドホビル、テノフォビル）を用いた。シスプラチンの定量は ICP-MS、メトホルミン及び抗ウイルス薬の定量は液体シンチレーションカウンターを用いて行った。

・（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、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。摘出組織試料は、本研究のために採取するものではなく、消化器がん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。なお、本研究計画の実施にあたり、「消化器に発現する薬物トランスポータ群の遺伝子解析に関する研究」（承認日：平成 13 年 8 月 7 日）、「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発現スクリーニング法の開発に関する研究」（承認日：平成 14 年 8 月 20 日）、「薬物の体内動態・薬効の個人差予測に関する臨床研究」（承認日：平成 16 年 1 月 19 日）が、京都大学医学部・医の倫理委員会において厳正に審議され承認されている。なお、上記ヒトを対象とした遺伝子解析研究計画並びに審査・承認過程は、平成 13 年 4 月 1 日に施行された文部科学省・厚生労働省・経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守するものである。

### C. 研究成果

#### 1) ヒト消化管における薬物トランスポータの発現解析

ヒト消化管（食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、膀胱）において、20 種類のトランスポータの mRNA 発現量を real-time PCR 法により定量した。PEPT1 は小腸において最も高く発現し、部位別の発現量は十二指腸>空腸>回腸であった（Fig. 1）。一方、食道、結腸、直腸にはほとんど発現していなかったが、胃では発現が認められた。これまで

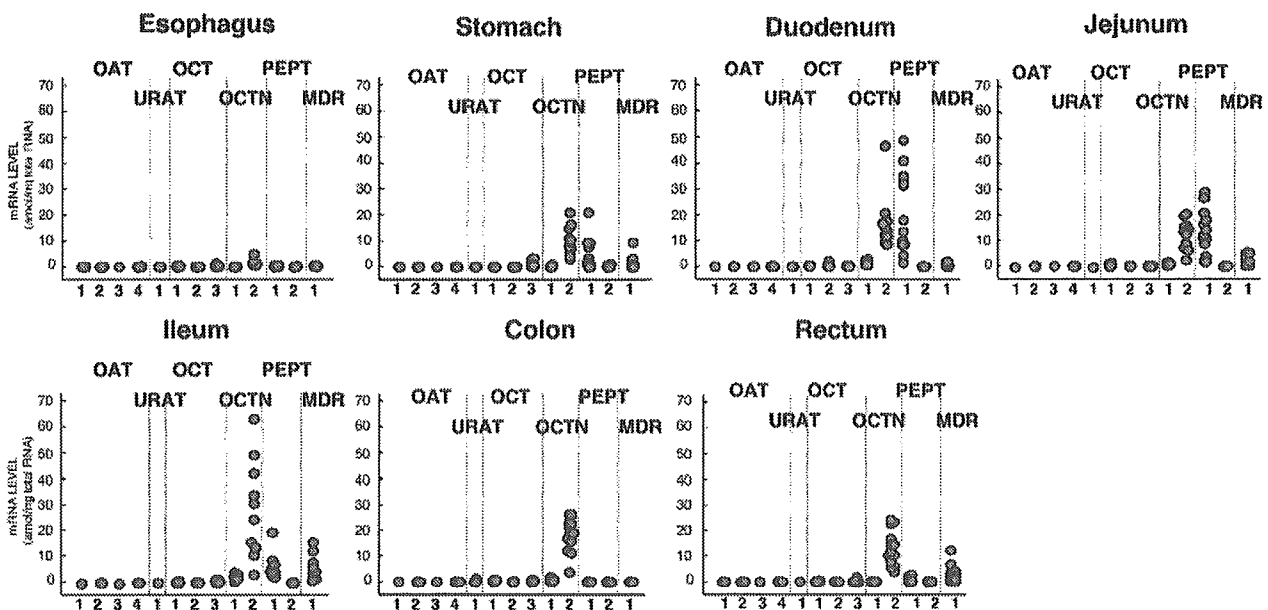


Fig. 1. ヒト消化管における種々薬物トランスポータの発現プロファイル

実験動物では PEPT1 が胃に発現している報告はない。そこで PEPT1 の発現の認められた胃の病理切片を用いて HE 染色並びに、上皮細胞の刷子縁膜のマーカーの一つである CD10 の免疫染色を行った。その結果、いずれの組織も腸上皮化生の発生していることがわかり、胃に発現する PEPT1 は腸上皮化生に由来することが示された。一方、PEPT2 はいずれの部位でも発現していなかった。

アミノ酸トランスポーター（刷子縁膜： $B^0$ AT1、ASCT2、 $b^0+$ AT；側底膜：LAT1-2、 $y^+$ LAT1、ATA2）の消化管における発現量・発現分布は、各トランスポーターにより様々であった。興味深いことに、刷子縁膜において中性アミノ酸の輸送に major な役割を果たしている  $B^0$ AT1 の小腸における発現分布は、十二指腸<空腸<回腸であり、タンパク質吸収における PEPT1 との協調的役割が示唆された。

MDR1 の小腸における発現分布は、十二指腸<空腸<回腸であった (Fig. 1)。さらに大腸（結腸<直腸）においても、十二指腸や空腸と同程度の発現量を示した。一方、食道、胃、膵臓では発現が認められなかった。

有機イオントランスポーター (OCT1-3、OCTN1-2、OAT1-4、URAT1) 群では、OCTN2 を除いて、消化管全域においてほとんど発現が認められなかった (Fig. 1)。カルニチンを生理的基質とする OCTN2

は胃から直腸まで高い発現量を示した。

## 2) 薬物トランスポーターのプロモーター解析 2-1) PEPT1

PEPT1 プロモーター領域の deletion analysis の結果、転写開始部位の上流 35 から 172 bp 間の領域が PEPT1 の転写活性に重要であることが明らかとなった。この領域には TATA box は存在せず、基礎転写因子の一つである Sp1 が結合すると推定される GC box が複数存在した。これら推定 Sp1 結合サイトにそれぞれ変異を導入することにより転写活性は低下し、また、Caco-2 細胞の核抽出液を用いた Gel Shift Assay により、推定 Sp1 結合サイトと Sp1 の結合が確認された。さらに、PEPT1 の転写活性は、Sp1 の過剰発現により上昇し、Sp1 と DNA との結合阻害剤である mithramycin A 処理により低下した。これらの結果から、ヒト PEPT1 プロモーターの basal activity には Sp1 が複数の結合部位を通して寄与していることが示された。

Sp1 の発現分布はユビキタスであり、PEPT1 の小腸特異的な発現を説明することはできない。そこで、PEPT1 の組織特異性を規定する因子の候補として、腸管特異的な転写因子であり、小腸上皮細胞の分化や機能維持に重要な役割を果たしている Cdx2 に着目した。Caco-2 細胞で Cdx2 を過剰発現させた場合、

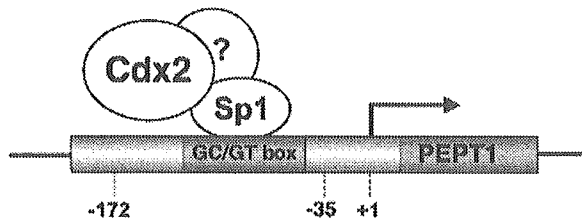


Fig. 2. PEPT1 の転写制御機構. Cdx2 は Sp1 と複合体を形成し、Sp1 binding sites を介して PEPT1 の転写活性に関与している

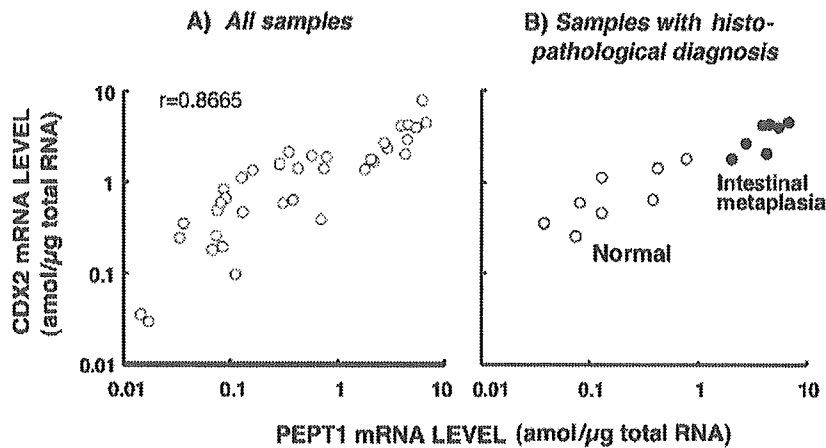


Fig. 3. 胃における PEPT1 と Cdx2 mRNA 発現の相関

PEPT1のプロモーター活性は顕著に上昇したが、プロモーター上における Cdx2 の反応領域は basal activity に重要であった領域と同一であり、Cdx2 の結合配列は存在しなかった。そこで、Cdx2 の作用機序について、共発現系、クロマチン免疫沈降法等の検討を加えた結果、Cdx2 は Sp1 と相互作用することにより PEPT1 プロモーター領域に作用し、転写を活性化させることが示された (Fig. 2)。これまで、Cdx2 は直接プロモーター領域に結合し転写を制御すると考えられていたが、今回初めて Cdx2 はプロモーター領域には直接結合せず、Sp1 と相互作用することによって転写を制御していることが示され、この制御機構は生化学的にも非常に興味深いと考えられる。また、ヒトの胃組織 (腸上皮化生の検体を含む) における PEPT1 と Cdx2 の mRNA 発現量は良好な相関を示した (Fig. 3)。これは PEPT1 発現調節における Cdx2 の重要性を *in vivo* の面からも支持する結果である。

## 2-2) OCT2

5'-RACE 法によりヒト OCT2 の転写開始部位が翻訳開始部位より 385 bp 上流に存在することが判明した。レポーターアッセイは、有機カチオン輸送系の発現していることが報告されている LLC-PK<sub>1</sub> 細胞を用いて行った。OCT2 プロモーター領域の deletion analysis の結果、転写開始部位より上流 100 bp 付近

に基礎発現に重要なシスエレメントが存在する可能性が示唆された。この領域には基礎転写に参与する CCAAT box と相同性の高い領域が存在した。CCAAT box に変異を導入したところ、プロモーター活性の減少が認められた。さらに、CCAAT box に結合する転写因子 NF-Y の結合阻害薬である genistein によってもプロモーター活性が減少した。また、LLC-PK<sub>1</sub> 細胞の核抽出液を用いた Gel Shift Assay により、CCAAT box を含む領域に転写因子の結合していることが示された。以上より、OCT2 の基礎転写には CCAAT box が重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 2-3) OAT3

5'-RACE 法によりヒト OAT3 の転写開始部位が翻訳開始部位より 126 bp 上流に存在することが判明した。レポーターアッセイは、有機アニオン輸送系の発現していることが報告されている OK 細胞を用いて行った。OAT3 プロモーター領域の deletion analysis の結果、転写開始部位の上流 77 から 214 bp 間の領域が、OAT3 の転写活性に重要であることが明らかとなった (Fig. 4)。この領域において転写因子の結合部位を検索したところ、Sp1 が結合する GC Box、NF-Y などの転写因子が結合する CCAAT box、そして cAMP Responsible Element Binding Protein (CREBP)/c-Jun の結合する CRE と相同性の高い領域

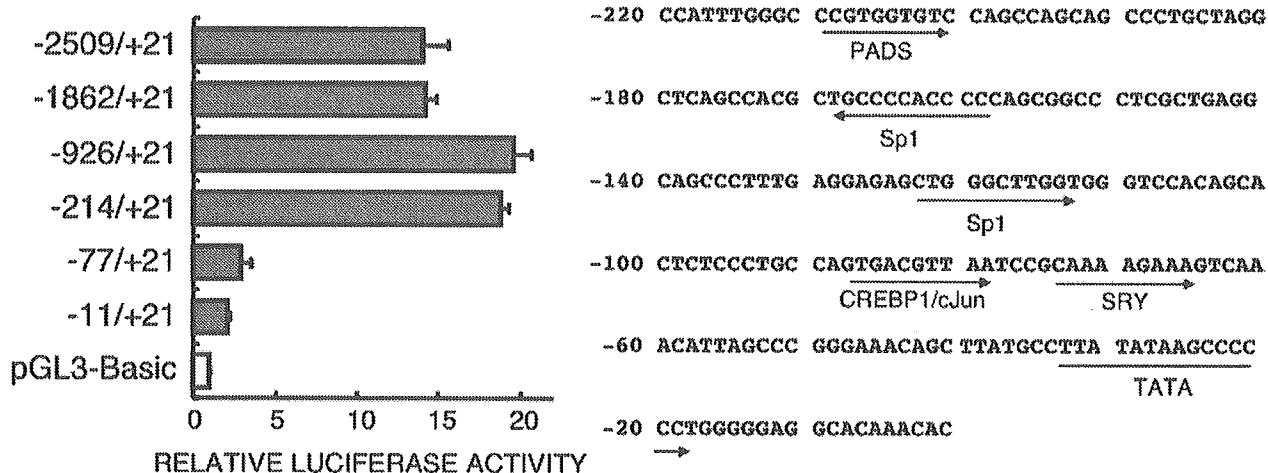


Fig. 4. デリションコンストラクトを用いた OAT3 プロモーター解析 (左図) と、OAT3 転写開始部位上流 220 bp における推定転写因子結合部位 (右図)

などが存在した (Fig. 4)。現在、これらの転写因子のうちどの転写因子が OAT3 の基礎発現に関与しているのか、レポーターアッセイや Gel Shift Assay を行い検討中である。

### 3) 薬物トランスポータの輸送解析

#### 3-1) OCT2 を介した抗がん剤シスプラチンの輸送解析

シスプラチンは腎臓に濃縮的に取り込まれ、尿管に強い障害を引き起こすことによって、腎機能を低下させることが知られている。また *in vitro* の検討より刷毛縁膜側よりもむしろ側底膜側から強い細胞毒性を示すことから、側底膜に発現するトランスポータの関与が示唆されている。そこで、OCT2 がシスプラチンを輸送することによって、腎特異的な毒性発現を媒介しているのではないかと仮説を立て、検討を行った。

シスプラチンによる細胞毒性に対するトランスポータ発現の影響を調べたところ、ラット OCT2 (rOCT2) 発現により細胞毒性が顕著に増強され、さらに白金の蓄積量の増大が認められた (Fig. 5)。一方、肝臓に発現するトランスポータ rOCT1 では取り込み上昇は認められなかった。次に、ラット腎臓の rOCT2 発現には雄性ホルモンにより制御を受ける性差が認められるため、この差を利用して *in vivo* における rOCT2 の役割を検討した。シスプラチンの腎臓への組織取り込みクリアランスは雄性ラットにおいて雌性ラットに比べ有意に高いのに対し、肝臓

への取り込みクリアランスに差は認められなかった。また、ヒト OCT2 発現細胞においてもシスプラチンによる細胞毒性の顕著な増強が認められた。

#### 3-2) OCT2 を介したメトホルミンの輸送

メトホルミンは2型糖尿病患者の治療に用いられるカチオン性薬物であり、大部分が未変化体のまま尿中排泄される。メトホルミンの作用機序の一つとして肝臓における糖新生抑制が想定されているが、糖新生の20-50%は腎臓が担っていること、さらに2型糖尿病患者では、糖新生における腎臓の寄与率が上昇することが報告されている。このような背景のもと、有機カチオントランスポータ OCT1 及び OCT2 に焦点を当て、メトホルミンの輸送実験を行った。その結果、OCT2 は OCT1 に比べて高いメトホルミン輸送活性を示した。また、rOCT2 発現の性差を利用して *in vivo* における rOCT2 の役割を調べたところ、メトホルミンの腎取り込みクリアランスは、雄性ラットが雌性ラットの2倍高値であったことから、メトホルミンの腎移行には OCT2 が主要なトランスポータとして関与していることが示された。

#### 3-3) OAT1 及び OAT3 を介した抗ウイルス薬の輸送

抗ウイルス薬アデホビル、シドホビル、テノホビルの用量規定因子は腎障害であり、これら抗ウイルス薬の尿細管分泌機構が腎障害に関連していると考えられる。これまでに OAT1 がアデホビル、シドホビル、テノホビルを基質とすることが報告されてい

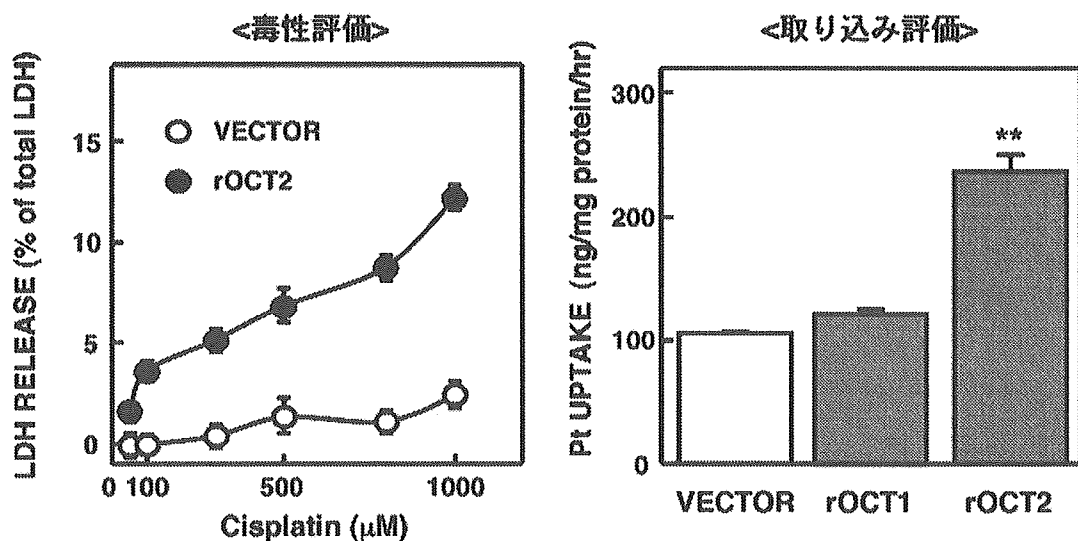


Fig. 5. シスプラチンの毒性発現に及ぼす rOCT2 発現の影響 (左図) と rOCT2 を介したシスプラチン輸送 (右図)



るが、他の有機イオントランスポータに関する情報は皆無である。そこで、種々有機イオントランスポータ発現細胞を用いて薬物輸送実験を行った。OAT3 の発現によって、これら抗ウイルス薬の細胞への取り込みは上昇した。また、プロベネシドはこれら抗ウイルス薬の取り込みを有意に阻害した。しかし、OAT3 を介した抗ウイルス薬の輸送活性は、OAT1 に比べ弱かった。また、有機カチオントランスポータ OCT1 及び OCT2 を介した抗ウイルス薬の輸送は認められなかった。以上の結果から OAT1 に加えて、OAT3 もアデホビル、シドホビル、テノホビルを基質とすることが判明した。

#### D. 考察

経口用β-ラクタム抗生物質、抗ウイルス薬（バラシクロビル、バルガンシクロビルなど）、ACE 阻害薬などペプチド類似薬物の腸管吸収において重要な役割を果たしている PEPT1 の消化管分布について検討したところ、十二指腸>空腸>回腸の順に発現していることが判明した。さらに胃においても PEPT1 の発現が認められ、それは腸上皮化生に由来することが判明した。プロモーター解析により PEPT1 の小腸特異的な発現には、Cdx2 が関与していることが明らかになったが、ヒトの胃組織（腸上皮化生の検体を含む）における PEPT1 と Cdx2 の mRNA 発現量は良好な相関を示したことから、PEPT1 の発現制御には Cdx2 が重要な役割を果たしていることが *in vivo* においても実証された。また PEPT1 のプロモーター解析によって、Cdx2 が基礎転写因子である Sp1 と相互作用をすることが明らかになった。両転写因子の相互作用に関する報告は初めてのものであり、この相互作用に関する解析は生化学的および発生学的観点からも興味をもたれる。今後は PEPT1 の発現量に及ぼす PEPT1 プロモーターの rSNP 探索や Sp1 あるいは Cdx2 の cSNP 解析を通して、PEPT1 の発現制御に関与するゲノム情報を見出していくことが課題と考えられる。

消化管における有機イオントランスポータファミリーの発現分布を調べたところ、OCTN2 以外の発現はほとんど認められなかった。すなわち、有機イオン性薬物の体内動態を考える際には、消化管での動態はそれほど考慮に入れる必要がないことが予想される。OCTN2 の発現は胃から直腸まで広範囲に広がり発現量も非常に高いこと、また OCTN2 は生理的基質であるカルニチンに加えてベラパミルのような薬物も輸送することから、OCTN2 が薬物の腸管吸収

に何らかの役割を担っていることが推察される。OCTN2 の遺伝子変異はカルニチン欠乏症を引き起こすことが知られているが、これらの患者における OCTN2 基質薬物の体内動態の変動を調べることは興味深い。Oct1<sup>+/+</sup>マウスを用いた検討より、Oct1 はカチオン性薬物の消化管分泌に大きな役割を果たしていることが報告されている。しかし、本研究で明らかになったように、ヒト消化管における OCT1 の発現はほとんど認められなかった。齧歯類では、OCT1 は腎臓に発現しているが、ヒトでは腎臓に発現していないなど、OCT1 の発現には種差の認められることから、消化管における発現や役割においても種差の存在することが考えられる。

申請者は、平成 15~16 年度に行った厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）の研究成果として、メサンギウム増殖性糸球体腎炎患者では、OAT3 mRNA 発現量がアニオン性抗生物質セファゾリン排泄能の良好な予測因子となることを報告した。また、内因性カチオンである N-methylnicotinamide (NMN) の腎排泄には OCT2 発現量が影響していることも見出している。そこで、OAT3 及び OCT2 の発現制御の基本メカニズムを解明することを目指して、両トランスポータのプロモーター解析を行った。両トランスポータとも、転写開始部位より上流 100 bp 付近に基礎発現に重要なシスエレメントの存在する可能性が示唆された。一般に基礎発現に関与するシスエレメントとしては、TATA box、GC box、CCAAT box の 3 種類が知られている。Deletion construct や変異体を用いた解析より、OCT2 及び OAT3 のプロモーターにおいては、CCAAT box 等のシスエレメントが基礎転写に関与していることが予想される。薬物代謝酵素 CYP2A6 の rSNP として CCAAT box の変異が報告されているが、OCT2 及び OAT3 のプロモーターでは CCAAT box の rSNP は見出されていない（分担研究者小川の成果参照）。今後、gel shift assay によるスーパーシフトの解析を通して、どのような転写因子が両プロモーターの基礎転写に関与しているのか解明し、これら転写因子の cSNP 等を解析していく必要があると考えられる。

種々薬物トランスポータの新規基質薬物の検索を行ったところ、抗がん剤シスプラチンやビグアナイド系糖尿病治療薬メトホルミンが、OCT2 によって輸送されることがわかった。また抗ウイルス薬であるアデホビル、シドホビル、テノホビルは、OAT1 に加えて、OAT3 にも輸送されることが明らかになった。このように臨床上繁用されており、重篤な副

作用を引き起こす薬物の輸送に関わるトランスポータを同定することは、今後の臨床薬物動態解析に有用な情報を提供するものと考えられる。

## E. 結論

PEPT1 のヒト消化管における発現は十二指腸>空腸>回腸の順であり、腸上皮化生に伴い胃にも発現することがわかった。また、PEPT1 の基礎転写には Sp1 が、また臓器特異的な発現調節には Cdx2 が関与していることが判明した。一方、有機イオントランスポータは OCTN2 を除いてほとんど消化管には発現していなかった。ヒト OCT2 並びに OAT3 の基礎転写には CCAAT box を含む領域が関与していることが判明した。OCT2 の新しい基質薬物として、抗がん剤シスプラチンとビグアナイド系糖尿病治療薬メトホルミンを見出した。

## 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. 寺田智祐, 乾 賢一: 薬物トランスポーター研究の現状と将来. *臨床化学*, **34**(1) 20-26 (2005)
2. Kimura, N. Okuda, M. and Inui, K.: Metformin transport by renal basolateral organic cation transporter hOCT2. *Pharm. Res.*, **22**(2), 255-259 (2005)
3. 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)
4. Shimizu, Y., Masuda, S., Nishihara, K., Ji, L., Okuda, M. and Inui, K.: Increased protein level of PEPT1 intestinal H<sup>+</sup>/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)
5. Irie, M., Terada, T., Katsura, T., Matsuoka, S. and Inui, K.: Computational modelling of H<sup>+</sup>-coupled peptide transport via human PEPT1. *J. Physiol.*, **565**(2), 429-439 (2005)
6. Urakami, Y., Kimura, N., Okuda, M., Masuda, S., Katsura, T. and Inui, K.: Transcellular transport of creatinine in renal tubular epithelial cell line LLC-PK<sub>1</sub>. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20**(3), 200-205 (2005)
7. Shimakura, J., Terada, T., Katsura, T. and Inui, K.: Characterization of the human peptide transporter PEPT1 promoter: Sp1 functions as a basal transcriptional regulator of human PEPT1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **289**(3), G471-G477 (2005)
8. Ueo, H., Motohashi, H., Katsura, T. and Inui, K.: Human organic anion transporter hOAT3 is a potent transporter of cephalosporin antibiotics, in comparison with hOAT1. *Biochem. Pharmacol.*, **70**(7), 1104-1113 (2005)
9. Kimura, N., Masuda, S., Tanihara, Y., Ueo, H., Okuda, M., Katsura, T., Inui, K.: Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20**(5), 379-386 (2005)
10. Nishio, N., Katsura, T., Ashida, K., Okuda, M. and Inui, K.: Modulation of P-glycoprotein expression in hyperthyroid rat tissues. *Drug Metab. Dispos.*, **33**(11), 1584-1587 (2005)
11. 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.*, **230**(1), 72-80 (2005)
12. Terada, T., Shimada, Y., Pan, X., Kishimoto, K., Sakurai, T., Doi, R., Onodera, H., Katsura, T., Imamura, M. and Inui, K.: Expression profiles of various transporters for oligopeptides, amino acids and organic ions along the human digestive tract. *Biochem. Pharmacol.*, **70**(12), 1756-1763 (2005)
13. Yonezawa, A., Masuda, S., Nishihara, K., Yano, I., Katsura, T. and Inui, K.: Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, **70**(12), 1823-1831 (2005)
14. Sakurai, Y., Motohashi, H., Ogasawara, K., Terada, T., Masuda, S., Katsura, T., Mori, N., Matsuura, M., Doi, T., Fukatsu, A., and Inui, K.: Pharmacokinetic significance of renal OAT3

- (SLC22A8) for anionic drug elimination in patients with mesangial proliferative glomerulonephritis. *Pharm. Res.*, 22(12) 2016-2022 (2005)
15. Niida, A., Tomita, K., Mizumoto, M., Tanigaki, H., Terada, T., Oishi, S., Otaka, A., Inui, K. and Fujii, N.: Unequivocal synthesis of (Z)-alkene and (E)-fluoroalkene dipeptide isosteres to probe structural requirements of the peptide transporter PEPT1. *Org. Lett.*, 8(4) 613-616 (2006)
  16. Irie, M., Terada, T., Tsuda, M., Katsura, T. and Inui, K.: Prediction of glycy sarcosine transport in Caco-2 cell lines expressing PEPT1 at different levels. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.*, 452(1) 64-70 (2006)
  17. Asaka, J., Terada, T., Okuda, M., Katsura, T. and Inui, K.: Androgen receptor is responsible for rat organic cation transporter 2 (rOCT2) gene regulation but not for rOCT1 and rOCT3. *Pharm. Res.*, in press.
  18. Shimakura, J., Terada, T., Shimada, Y., Katsura, T. and Inui, K.: The transcription factor Cdx2 regulates the intestine-specific expression of human peptide transporter 1 through functional interaction with Sp1. *Biochem. Pharmacol.*, in press.
  19. Terada, T., Masuda, S., Asaka, J., Tsuda, M., Katsura, T. and Inui, K.: Molecular cloning, functional characterization and tissue distribution of rat H<sup>+</sup>/organic cation antiporter MATE1. *Pharm. Res.*, in press.
  20. Noshiro, R., Anzai, N., Sakata, T., Miyazaki, H., Terada, T., Shin, H.J., He, X., Miura, D., Inui, K., Kanai, Y. and Endou, H.: The PDZ domain protein PDZK1 interacts with human peptide transporter PEPT2 and enhances its transport activity. *Kidney Int.*, in press.
  21. Tsuda, M., Terada, T., Irie, M., Katsura, T., Niida, A., Tomita, K., Fujii, N. and Inui, K.: Transport characteristics of a novel PEPT1 substrate, antihypotensive drug midodrine, and its amino acid derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press.
2. 学会発表
1. 乾 賢一：薬物トランスポータの TDM 研究 (特別講演). 第 22 回日本 TDM 学会・学術大会 (2005 年 5 月、沖縄県宜野湾市)
  2. Inui, K.: Clinical implication of drug transporters. (Symposium) BioMedical Transporters 2005 (August 2005, Switzerland)
  3. Yonezawa, A., Masuda, S., Nishihara, K., Katsura, T. and Inui, K.: Role of rOCT2 in cisplatin-induced nephrotoxicity. BioMedical Transporters 2005 (August 2005, Switzerland)
  4. 寺田智祐、朝賀純一、桂 敏也、乾 賢一：ラット有機カチオントランスポータの転写制御機構. 第 11 回分子腎臓研究会 (2005 年 9 月、京都市)
  5. 朝賀純一、寺田智祐、桂 敏也、奥田真弘、乾 賢一：ラット有機カチオントランスポータ rOCT1-3 の転写活性に及ぼすテストステロンの影響. 第 1 回創剤フォーラム若手発表討論会 (2005 年 9 月、東京都)
  6. Inui, K.: Expression and gene regulation of drug transporters (SLC) -transcriptional mechanisms for PEPT1-. (Symposium) 13<sup>th</sup>ISSX/20<sup>th</sup>JSSX (October 2005, Hawaii)
  7. Tsuda, M., Terada, T., Katsura, T. and Inui, K.: Midodrine, an antihypotension drug, is transported by human H<sup>+</sup>/peptide cotransporter (PEPT1). 13<sup>th</sup>ISSX/20<sup>th</sup>JSSX (October 2005, Hawaii)
  8. Terada, T., Shimada, Y., Pan, X., Doi, R., Onodera, H., Katsura, T. and Inui, K.: Expression profiles of H<sup>+</sup>/peptide cotransporter (PEPT1) along the human digestive tract. 13<sup>th</sup>ISSX/20<sup>th</sup>JSSX (October 2005, Hawaii)
  9. Shimakura, J., Terada, T., Katsura, T. and Inui, K.: Characterization of the human H<sup>+</sup>/peptide cotransporter (PEPT1) promoter: critical role of Sp1 for the basal transcriptional regulation of PEPT1. 13<sup>th</sup>ISSX/20<sup>th</sup>JSSX (October 2005, Hawaii)
  10. 本橋秀之：腎薬物トランスポータ：発現変動ならびに腎疾患患者における薬物動態学的重要性. (シンポジウム) 第 27 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2005 年 11 月、京都市)
  11. 米澤 淳、増田智先、西原久美子、矢野育子、桂 敏也、乾 賢一：シスプラチン誘発腎毒性の規定因子としての有機カチオントランスポータ OCT2 (Slc22a2). 第 27 回生体膜と薬

- 物の相互作用シンポジウム (2005年11月、京都市)
12. 谷原悠子、木村尚子、増田智先、桂 敏也、乾 賢一：腎有機カチオントランスポータ OCT2 の基質認識特性. 第 27 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2005年11月、京都市)
  13. 島倉 仁、寺田智祐、桂 敏也、乾 賢一：ヒトペプチドトランスポータ (PEPT1, SLC15A1) の組織特異的発現を規定する転写調節機構. 第 27 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2005年11月、京都市)
  14. 寺田智祐、乾 賢一：ペプチドトランスポータの基礎と臨床. (シンポジウム) 第 26 回日本臨床薬理学会年会 (2005年12月、大分県別府市)
  15. Inui, K.: Physiological and clinical implication of drug transporters in the intestine. (Symposium) Joint International Symposium on Integrated Medicinal Science for Drug Discovery - Tradition to Structural Biology /Medicinal Science Research on Difficult Diseases (March 2006, Kyoto)
  16. 朝賀純一、寺田智祐、桂 敏也、乾 賢一：ヒト有機カチオントランスポータ (hOCT2) の発現調節機構. 日本薬剤学会第 21 年会 (2006年3月、金沢市)
  17. 西原久美子、増田智先、米澤 淳、桂 敏也、乾 賢一：腎不全状態が及ぼす小腸の機能変動に関連する因子の探索. 日本薬学会第 126 年会 (2006年3月、仙台市)
  18. 小笠原健、寺田智祐、本橋秀之、桂 敏也、乾 賢一：ヒト有機アニオントランスポータ OAT3 の転写制御機構. 日本薬学会第 126 年会 (2006年3月、仙台市)
  19. 岸本幸四朗、本橋秀之、上尾治正、桂 敏也、深津敦司、乾 賢一：腎疾患時におけるヒト有機カチオントランスポータ hOCT 発現変動の N-methylnicotinamide 腎クリアランスに及ぼす影響. 日本薬学会第 126 年会 (2006年3月、仙台市)
  20. 津田真弘、入江めぐみ、寺田智祐、桂 敏也、乾 賢一：H<sup>+</sup>駆動型ペプチドトランスポータ (PEPT1)発現量の異なるヒト培養腸上皮細胞 Caco-2 における glycy sarcosine 輸送の予測. 日本薬学会第 126 年会 (2006年3月、仙台市)
  21. 島倉 仁、寺田智祐、桂 敏也、乾 賢一：絶食時の小腸 PEPT1 発現亢進における PPAR $\alpha$ の関与. 日本薬学会第 126 年会 (2006年3月、仙台市)
- 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

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

肝臓がんに対する摘除術の施行と  
肝薬物トランスポータの発現・遺伝子多型解析

分担研究者 山岡 義生 田附興風会医学研究所 北野病院・病院長

【研究要旨】

肝臓の血管側膜及び胆管側膜には、種々薬物トランスポータが発現し、薬物の肝取り込みや、代謝物やその抱合体の胆汁分泌を媒介している。血管側膜には主に SLC トランスポータファミリーである、有機イオントランスポータファミリーや organic anion transporting polypeptide (OATP) ファミリーが、また胆管側膜には主に ABC トランスポータが発現している。これまで、*in vitro* 発現系や動物実験を用いた解析より、これら薬物トランスポータの輸送特性や薬物動態学的役割が明らかになりつつある。しかし、ヒト正常肝における発現プロファイルや発現制御機構に関する情報は乏しく、また発現量の個体差に関連する SNP 解析についてはほとんど研究が実施されていないのが現状である。このような不明点を解決するため、今年度は、臨床検体の肝 RNA と市販されている肝 RNA を用いて、19 種類の薬物トランスポータの発現量解析を行い発現プロファイル作成のための情報を収集した。その結果、肝臓では有機イオントランスポータファミリーに属する OCT1 及び OAT2 が高発現していた。一方、MDR1 や MRP2 など ABC トランスポータの発現は、これら両トランスポータに比べて少なかった。さらに肝臓で発現量の高かった OCT1 及び OAT2 のプロモーター解析を行ったところ、多くの遺伝子の肝発現を制御していることが報告されている転写因子 HNF-3 $\beta$  及び HNF-4 $\alpha$  が、両トランスポータの発現に関与していることが示された。これらの成果は、肝薬物トランスポータの発現・遺伝子多型プロファイル作成のための有用な基礎的知見になりうると考えられる。

A. 研究目的

肝臓は、薬物の代謝臓器であると同時に、様々な薬物の未変化体やその抱合代謝産物を胆汁中に排泄する役割を担っている。代謝及び胆汁排泄のいずれの場合も、循環血から肝臓への取り込み過程が薬物消失の第一ステップであり、水溶性の高い薬物に対しては、血管側膜上に発現する organic anion transporting polypeptide (OATP)、有機カチオントランスポータ (OCT)、有機アニオントランスポータ (OAT) 等の、二次性能動輸送体が薬物の肝取り込みに関与している。一方、胆管側膜上には ATP の加水分解を駆動力とする一次性能動輸送体 (MDR1、MRP2、BCRP など) が発現し、薬物や代謝物の胆汁中へ輸送を媒介している。これまで、*in vitro* 発現系

や動物実験を用いた解析より、これらトランスポータの輸送特性や薬物動態学的役割が明らかになりつつあるが、ヒト正常肝における発現プロファイル、発現制御機構、並びに発現量の個体差に関連する SNP の情報は乏しい。今年度は、臨床検体の肝 RNA と市販されている肝 RNA を用いて、薬物トランスポータの発現プロファイルを比較した。さらに、肝薬物トランスポータの rSNP 解析を行うための基礎情報収集のため、肝臓で発現量の高かった OCT1 及び OAT2 のプロモーター領域を単離し、転写制御機構に関する検討を加えた。

B. 研究方法

肝臓がん摘出術の施行された肝がん患者の非腫瘍

部より、total RNA を精製し、リアルタイム PCR 法によって組織中の薬物トランスポータ発現量を定量した。また市販されている肝臓の RNA を用いて同様の検討を行った。肝臓に高発現していた OCT1 及び OAT2 の転写開始部位を、5'-RACE 法により決定し、PCR 法によりプロモーター領域を単離した。プロモーターの deletion construct は制限酵素処理により作製した。転写活性は、各 construct を培養肝細胞 HepG2 に一過性に発現させ、ルシフェラーゼアッセイにより測定した。

#### (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、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。摘出組織試料は、本研究のために採取するものではなく、肝臓がん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。なお、本研究計画の実施にあたり、「消化器に発現する薬物トランスポータ群の遺伝子解析に関する研究」(承認日:平成13年8月7日)、「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発現スクリーニング法の開発に関する研究」(承認日:平成14年8月20日)、「薬物の体内動態・薬効の個人差予測に関する臨床研究」(承認日:平成16年1月19日)が、京都大学医学部・医の倫理委員会において厳正に審議され承認されている。なお、上記ヒトを対象とした遺伝子解析研究計画並びに審査・承認過程は、平成13年4月1日に施行された文部科学省・厚生労働省・経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守す

るものである。

## C. 研究成果

### 1) ヒト正常肝における薬物トランスポータ発現量プロファイルの比較

肝細胞がんの患者(57歳、男性、B型肝炎ウイルス(HB)(+))から得られた非腫瘍部の肝RNAと、市販されている正常肝RNAを用いて、19種類の主要な薬物トランスポータの発現量を定量し、今後解析対象とする薬物トランスポータの選定を行った(Fig. 1)。その結果、PEPT2、OCT2、OAT1、OAT3、OAT4、MRP4、MRP5は肝臓にほとんど発現していないことが示された。一方、有機カチオントランスポータ OCT1 及び有機アニオントランスポータ OAT2 は高発現していた。また、MDR1 や MRP2 などこれまで薬物の胆汁排泄に重要な役割を果たしていることが報告されている ABC トランスポータファミリーの発現量は、OCT1 や OAT2 に比べて低かった。ABC トランスポータファミリーの中では、MRP6 の発現量が最も高かった。一方、今回解析した正常の肝臓と B 型肝炎ウイルスに感染した肝臓由来の RNA 間で、発現量の大きく異なる薬物トランスポータは見出されなかった。今後本解析において見出された発現量の高い薬物トランスポータ群を中心に、発現解析を行う予定である。

### 2) 肝臓に発現する有機イオントランスポータのプロモーター解析

SLC トランスポータファミリーの中で、肝臓で発現量の多かった OCT1 及び OAT2 に焦点を当て、プロモーター解析を行った。

#### 2-1) OCT1

5'-RACE 法によりヒト OCT1 の転写開始部位が翻訳開始部位より 105 bp 上流に存在することが判明した。転写開始部位より上流約 2,500 bp のプロモーター領域を含むレポーターコンストラクトを作製し、レポーターアッセイを行った(Fig. 2)。レポーターアッセイは培養肝細胞 HepG2 を用いて行った。Deletion analysis の結果、全長(-2,512/+43)のコンストラクトではコントロールに対して約 5 倍のプロモーター活性を有していたが、-654/+43 のコンストラクトではその活性が約 60% に低下した。さらにプロモーター部位を削除していくと、-229/+43 のコンストラクトでは、約 10 倍の活性が認められたことから、上流 229 から 654 bp 間の領域に抑制的な因子の結合することが示唆された。この領域において転写

トランスポーター	HUGO名	主な輸送基質	RNA発現量(GAPDH比, x1,000)	
			正常肝	HB(+) <sup>肝</sup>
PEPT1	SLC15A1	β-ラクタム抗生物質、バラシクロビル	150	41
PEPT2	SLC15A2	β-ラクタム抗生物質、バラシクロビル	N.D.	N.D.
OCT1	SLC22A1	TEA、MPP、シメチジン	2211	2024
OCT2	SLC22A2	シメチジン、メトホルミン、シスプラチン	N.D.	N.D.
OCT3	SLC22A3	TEA、MPP	129	48
OCTN1	SLC22A4	L-カルニチン	6	N.D.
OCTN2	SLC22A5	L-カルニチン	47	13
OAT1	SLC22A6	抗ウイルス薬、利尿薬、MTX	N.D.	N.D.
OAT2	SLC22A7	NSAIDs、利尿薬	1202	475
OAT3	SLC22A8	セフェム系抗生物質、シメチジン、ファモチジン	N.D.	N.D.
OAT4	SLC22A11	NSAIDs、利尿薬	N.D.	N.D.
MDR1	ABCB1	抗がん剤、ジゴキシン、タクロリムス	28	44
MRP1	ABCC1	抗がん剤	22	8
MRP2	ABCC2	グルクロン酸抱合体	190	148
MRP3	ABCC3	グルタチオン抱合体	215	87
MRP4	ABCC4	抗ウイルス薬、MTX	10	N.D.
MRP5	ABCC5	MTX、抗HIV薬	13	N.D.
MRP6	ABCC6	MTX	570	203
BCRP	ABCG2	MTX、SN-38、ミトキサントロン	108	48

N.D. , Not detected

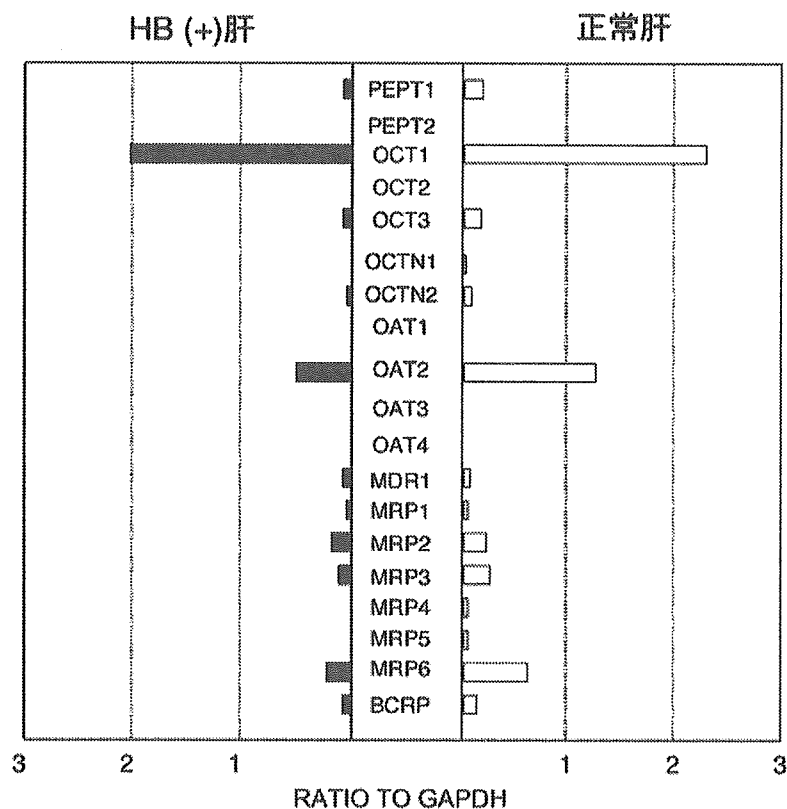


Fig. 1. 肝臓における種々薬物トランスポーターの発現量

因子の結合部位を検索したところ、Hepatocyte Nuclear Factor 3 $\beta$  (HNF-3 $\beta$ )の結合することが示唆された。そこで、OCT1 (-2,512/+43)のコンストラクトを用いて、HNF-3 $\beta$ 共発現の影響について調べたところ、OCT1 プロモーター活性の低下することが示され、HNF-3 $\beta$ がOCT1 発現の抑制因子として機能していることが示唆された。さらに、プロモーター領域を削除させると、-140~-70 の領域を欠失したデリレーションコンストラクトにおいて、ルシフェラーゼ活性が顕著に減少したことから、この領域に OCT1 の基礎転写に関わる配列の存在することが示唆された。この領域には、Fos、Jun、ATF 遺伝子群から構成される AP1 の結合領域が存在することから、これらの転写因子群が OCT1 の基礎転写に関与していることが示唆された。

## 2-2) OAT2

5'-RACE 法によりヒト OAT2 の転写開始部位が翻訳開始部位より 96 bp 上流に存在することが判明した。OCT1 と同様に転写開始部位より上流約 2,500 bp のプロモーター領域を含むレポーターコンストラクトを作製し、HepG2 を用いてレポーターアッセイを行った。その結果、pGL3-Basic に比べて約 3 倍プロモーター活性の上昇することがわかった。OAT2 のプロモーター領域に結合する転写因子の検索を行ったところ、多くの遺伝子の肝発現に重要な役割を果たしている HNF-4 $\alpha$ の結合する領域が、転写開始部位より約 320 bp 上流に存在することがわかった。そこで、HNF-4 $\alpha$ 共発現の影響について調べたところ、

OAT2 プロモーター活性が顕著に促進することが示され、HNF-4 $\alpha$ が OAT2 の肝発現に関与していることが示唆された。

## D. 考察

肝臓における種々薬物トランスポータの発現解析を行うため、19 種類のトランスポータ発現量を定量した。その結果、OCT1 及び OAT2 の発現が大きく、これまで報告されている Northern Blotting の結果ともよく対応していた。一方、ABC トランスポータファミリーでは、MDR1 や MRP2 など薬物動態学的役割が明らかになっているトランスポータでさえ、OCT1 発現の 1~10%と低い発現量を示した。ABC トランスポータは ATP の加水分解を駆動力とする一次性能動輸送体であり、1 分子で強力な輸送能を発揮することから発現量は少なくとも十分であることが推察される。一方 SLC トランスポータの駆動力は ATP の加水分解エネルギーに比べてそれほど強力ではないため、輸送量の保持を発現量を増加させることによって担保しているものと予想される。平成 18 年度以降は、更に症例数を増やして肝臓における薬物トランスポータの発現プロファイルと個体間変動の究明を目指す予定である。

肝臓に発現する OCT1 及び OAT2 のプロモーター解析を行ったところ、OCT1 では HNF-3 $\beta$ が、また OAT2 では HNF-4 $\alpha$ が両トランスポータの発現制御に関わる転写因子として示された。これらの転写因子の遺伝子変異は、成人型糖尿病の一種 MODY の発症因子であることが知られており、これらの患者

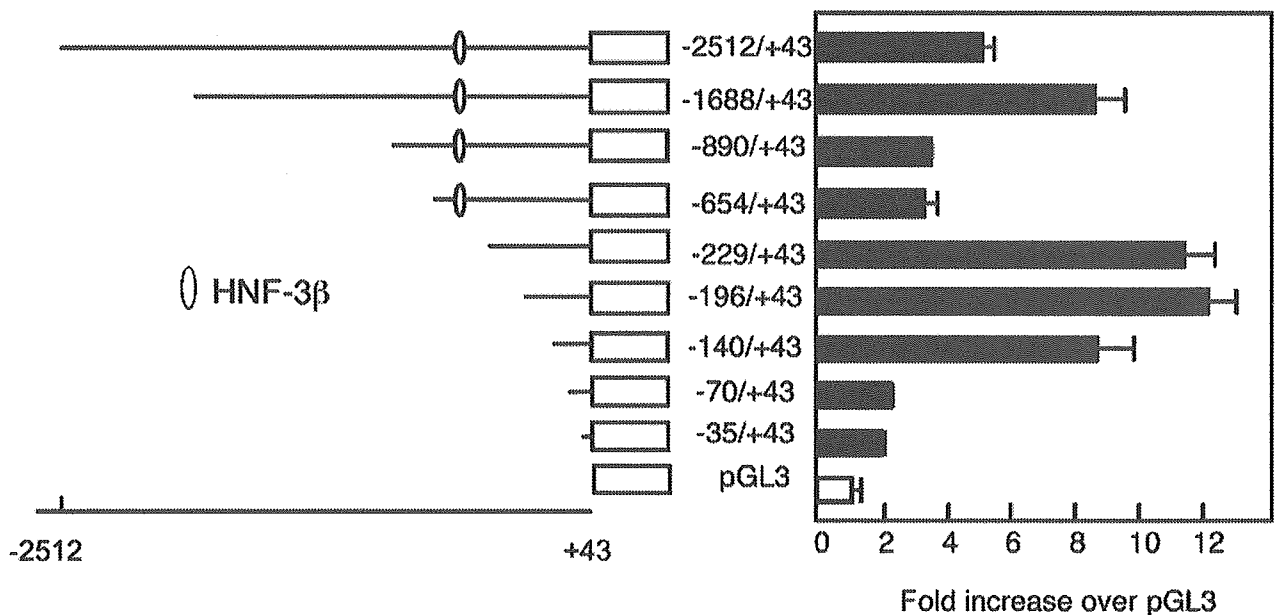


Fig. 2. HepG2 細胞における OCT1 プロモーターの deletion analysis



においては、OCT1 や OAT2 の肝発現が変化している可能性が考えられる。今後は、ヒト肝臓のサンプルを用いて、薬物トランスポータの発現量解析とゲノム解析を並行して行うことによって、有用なゲノム情報の同定を試みる予定である。

#### E. 結論

肝臓では有機イオントランスポータファミリーである OCT1 及び OAT2 が高発現していた。一方、MDR1 や MRP2 など ABC トランスポータの発現は、これら両トランスポータに比べて少なかった。OCT1 及び OAT2 のプロモーター解析を行ったところ、HNF-3 $\beta$ 及び HNF-4 $\alpha$ が両トランスポータの発現に関与してい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. Yamanokuchi, S., Ikai, I., Nishitai, R., Matsushita, T., Sugimoto, S., Shiotani, T. and Yamaoka Y.: Asialo GM1 positive CD8+ T cells induce skin allograft rejection in the absence of the secondary lymphoid organs. *J. Surg. Res.*, **129**(1), 57-63 (2005)
2. Pawlik, T.M., Delman, K.A., Vauthey, J.N., Nagorney, D.M., Ng, I.O., Ikai, I., Yamaoka, Y., Belghiti, J., Lauwers, G.Y., Poon, R.T. and Abdalla, E.K.: Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: Implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.*, **11**(9), 1086-1092 (2005)
3. Yamagami, K., Hutter, J., Yamamoto, Y., Schauer, R.J., Enders, G., Leiderer, R., Ozen, O., Hammer, C., Yamaoka, Y. and Messmer, K.: Synergistic effects of brain death and liver steatosis on the hepatic microcirculation. *Transplantation*, **80**(4), 500-505 (2005)
4. Ng, K.K., Vauthey, J.N., Pawlik, T.M., Lauwers, G.Y., Regimbeau, J.M., Belghiti, J., Ikai, I., Yamaoka, Y., Curley, S.A., Nagorney, D.M., Ng, I.O., Fan, S.T. and Poon, R.T.: International Cooperative Study Group on Hepatocellular

Carcinoma: Is hepatic resection for large or multinodular hepatocellular carcinoma justified? Results from a multi-institutional database. *Ann. Surg. Oncol.*, **12**(5), 364-373 (2005)

5. Fujita, S., Ueda, Y., Ko, I.K., Paek, H.J., Sajiki, T., Ikai, I., Yamaoka, Y., Ikada, Y. and Iwata, H.: Functional evaluation of bioartificial liver using RT-PCR. *Biomed. Mater. Eng.*, **15**(3), 211-218 (2005)
6. Suetsugu, H., Iimuro, Y., Uehara, T., Nishio, T., Harada, N., Yoshida, M., Hatano, E., Son, G., Fujimoto, J. and Yamaoka, Y.: Nuclear factor {kappa}B inactivation in the rat liver ameliorates short term total warm ischaemia/reperfusion injury. *Gut*, **54**(6), 835-842 (2005)
7. Sugimoto, S., Harada, K., Shiotani, T., Ikeda, S., Katsura, N., Ikai, I., Mizuguchi, T., Hirata, K., Yamaoka, Y. and Mitaka, T.: Hepatic organoid formation in collagen sponge of cells isolated from human liver tissues. *Tissue Eng.*, **11**(3-4), 626-633 (2005)
8. Yonezawa, K., Tolba, R.H., Wetter, A., Yamamoto, Y., Yamaoka, Y. and Minor, T.: L-carnitine could not improve hepatic warm ischemia-reperfusion injury despite ameliorated blood flow. *J. Surg. Res.*, **125**(1), 16-22 (2005)
9. Pawlik, T.M., Poon, R.T., Abdalla, E.K., Ikai, I., Nagorney, D.M., Belghiti, J., Kianmanesh, R., Ng, I.O., Curley, S.A., Yamaoka, Y., Lauwers, G.Y. and Vauthey, J.N.: Hepatectomy for hepatocellular carcinoma with major portal or hepatic vein invasion: results of a multicenter study. *Surgery*, **137**(4), 403-410 (2005)
10. Nishitai, R., Ikai, I., Shiotani, T., Katsura, N., Matsushita, T., Yamanokuchi, S., Matsuo, K., Sugimoto, S. and Yamaoka, Y.: Absence of PERV infection in baboons after transgenic porcine liver perfusion. *J. Surg. Res.*, **124**(1), 45-51 (2005)
11. Okuyama, H., Nakamura, H., Shimahara, Y., Uyama, N., Kwon, Y.W., Kawada, N., Yamaoka, Y. and Yodoi, J.: Overexpression of thioredoxin prevents thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *J. Hepatol.*, **42**(1), 117-123 (2005)

##### 2. 学会発表

特になし

#### 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

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

腎臓がんに対する摘除術の施行と  
ゲノム情報と臨床データの相関解析

分担研究者 小川 修 京都大学医学部附属病院泌尿器科学教授

【研究要旨】

腎臓の近位尿細管上皮細胞の側底膜並びに刷子縁膜には、様々な薬物トランスポータが発現し、薬物や代謝産物の効率的な尿細管分泌を媒介している。近年、これら腎薬物トランスポータ発現量の個体差が、薬物腎排泄の個体差に密接に関わっていることが明らかにされてきたが、発現量の個体差を規定する因子については未だ不明である。本研究では、腎薬物トランスポータ発現情報のデータ拡充と、主に腎臓に発現する有機イオントランスポータ（OCT2、OAT1、OAT3、OAT4）に焦点を当て、各トランスポータのプロモーター領域の遺伝子多型（rSNP）を解析し、発現量との相関について調べた。発現解析の結果、有機アニオントランスポータ（OAT3 及び OAT1）、尿酸トランスポータ（URAT1）や有機カチオントランスポータ（OCT2）の発現が高く、ペプチドトランスポータ（PEPT）並びに ABC トランスポータの発現は相対的に低かった。各トランスポータの発現量には最大約 100 倍以上の差が認められたが、年齢や性差をはじめとする臨床情報とトランスポータ発現量との間に関連は見いだされなかった。プロモーター上流約 1 kb の rSNP 解析の結果、OCT2 において-578~-576 位の AAG を欠失する変異が見出された。この変異をヘテロでもつ群では変異を有さない群に比べ OCT2 発現量の低下傾向が認められ、また、レポーターアッセイにおいてもこの変異がプロモーター活性低下を引き起こした。OAT4 では C-18 T の rSNP が見付き、発現解析やプロモーター解析によって、これらの変異を有すると OAT4 の発現が上昇することが示唆された。一方、OAT1 や OAT3 では、プロモーター上流約 1 kb において発現量に影響を及ぼす変異は見出されなかった。これらの研究成果は、腎薬物トランスポータ発現量の個体差を解明する有用な情報になると考えられる。

A. 研究目的

腎臓は肝臓と共に、生体異物の解毒機構として重要な役割を果たしている。なかでも、近位尿細管に発現する有機イオントランスポータは、カチオンあるいはアニオンに荷電した、薬物や代謝産物の尿細管分泌を媒介し、生体防御システムの一つとして重要な役割を担っている。主任研究者乾らによって、有機イオントランスポータ発現量の個体差が、薬物排泄の個体差に関連していることが明らかにされ、発現量の個体差に影響を及ぼす因子の同定が次の課題として考えられている。これまで、尿細管障害と対応すると考えられている尿タンパク量、N-アセ

チルグルコサミド量、b2 ミクログロブリン量、肝臓型脂肪酸結合タンパク（L-FABP）と薬物トランスポータ発現量との相関について調べられたが、未だ有意な相関は得られていない。そこで、本研究では腎薬物トランスポータ発現量解析のための例数を増やすと共に、主に腎臓に発現する有機イオントランスポータ（OCT2、OAT1、OAT3、OAT4）に焦点を当て、各トランスポータのプロモーター領域の遺伝子多型（rSNP）と発現量との相関について調べた。

B. 研究方法

根治的腎摘除が施行された腎腫瘍患者の正常組織

部より、total RNA を精製し、リアルタイム PCR 法によって組織中の薬物トランスポータ発現量を定量した。また、正常部よりゲノム DNA を精製し、OCT2、OAT1、OAT3 及び OAT4 のプロモーター部位を PCR により増幅しダイレクトシーケンスを行うことによって、遺伝子多型解析を行った。また主任研究者乾らによって作成された、各薬物トランスポータのプロモーター領域を含んだレポーターコンストラクトを用いて、遺伝子多型解析によって見出された変異体を作製した。レポーターアッセイは、培養腎上皮細胞 (LLC-PK<sub>1</sub> または OK) に一過性に発現させ、ルシフェラーゼアッセイにより測定した。

#### (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、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。摘出組織試料は、本研究のために採取するものではなく、腎臓がん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。なお、本研究計画の実施にあたり、「消化器に発現する薬物トランスポータ群の遺伝子解析に関する研究」(承認日：平成 13 年 8 月 7 日)、「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発現スクリーニング法の開発に関する研究」(承認日：平成 14 年 8 月 20 日)、「薬物の体内動態・薬効の個人差予測に関する臨床研究」(承認日：平成 16 年 1 月 19 日)が、京都大学医学部・医の倫理委員会において厳正に審議され承認されている。なお、上記ヒトを対象とした遺伝子解析研究計画並びに審査・承認過程は、平成 13 年 4 月 1 日に施行された文

部科学省・厚生労働省・経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守するものである。

## C. 研究成果

### 1) ヒト正常腎組織における薬物トランスポータの発現量解析

本年度は、すでに本研究計画以前に収集された 82 例に加え最終的に 109 名の腎腫瘍患者について正常腎組織部における発現量を測定した。トランスポータはペプチドトランスポータ (PEPT) や有機イオントランスポータ (OCT/OCTN/OAT/URAT)、ABC トランスポータファミリー (MDR1/MRP) など、合計 19 種の薬物トランスポータについて検討した。その結果、有機アニオントランスポータ (OAT3 及び OAT1)、尿酸トランスポータ (URAT1) や有機カチオントランスポータ (OCT2) の発現が相対的に高く、PEPT1、PEPT2 並びに ABC トランスポータの発現は相対的に低かった。各トランスポータの発現量には最大約 100 倍以上の差が認められた。これらの発現量の違いについて、患者情報との比較を行ったが、年齢や性差をはじめとする臨床情報とトランスポータ発現量との間に関連は見いだされなかった。従って、これらトランスポータ発現量の個人差についてさらに精査が必要であると考えられた。

### 2) 有機イオントランスポータの rSNP 解析

プロモーター部位は mRNA の発現を制御しており、その部位における変異 (regulatory SNP: rSNP) が mRNA の発現量を変化させることが知られている。そこで発現解析で腎における発現の多かった OCT2、OAT1、OAT3、OAT4 について、rSNP の探索を行った。解析領域は転写開始部位より上流約 1 kb とした。性別、腎疾患、糖尿病により mRNA の発現量に変化することが報告されているため、これら要因の影響を除くため、解析対象を根治的腎摘除が施行された腎腫瘍患者から、Clear cell carcinoma と診断され、なおかつ腎不全、糖尿病を併発していない男性患者 25 名に絞り込んだ。

#### 2-1) OCT2

-578~-576 位の AAG を欠失する変異が見出された。この変異は、今までに報告されていない変異であり、アレル頻度は 14.0%であった。発現量への影響を調べたところ、この変異をヘテロでもつ群では変異を有さない群に比べ OCT2 発現量の低下傾向が認められた。また、レポーターアッセイにおいてもこの変