

異が OCT2 のプロモーター活性を低下させることを確認した (Fig. 1)。

## 2-2) OAT1

今回検索した OAT1 のプロモーター領域 (1 kb) では、rSNP は認められなかった。

## 2-3) OAT3

5 つの変異が見出された。それらは、-659 位に G が挿入される変異 (-659--658insG、アレル頻度 86.0%)、-578 位の C が G に置換する変異 (-578C>G、アレル頻度 86.0%)、-515 位の A が C に置換する変異 (-515A>C、アレル頻度 86.0%)、-461 位の T が C に置換する変異 (-461T>C、アレル頻度 30.0%)、-19 位の C が A に置換する変異 (-19C>A、アレル頻度 4.0%) であり、そのうち -19C>A は今までに報告されていない変異である。発現量への影響を調べたが、いずれの変異も発現量に与える影響は少ないと考えられた。また、レポーターアッセイを行ったが、これらの変異は OAT3 のプロモーター活性を変化させなかった。従って、これらの変異が発現量を変化させる可能性は低いと考えられた。

## 2-4) OAT4

-18 位 C が T に置換する変異が見つかり、アレル頻度は 4.0% 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 OAT4 の発現量の上昇する傾向が認められた。また、レポーターアッセイにおいて、この変異が OAT4 のプロモーター活性を増加させることが示された (Fig. 2)。

## D. 考察

これまでの研究から、腎側底膜に発現する有機アニオントランスポータ OAT3 の発現量が、アニオン性抗生物質セファゾリンの腎排泄速度を規定することが明らかになっている。従って、薬物トランスポータ発現量の個体差を規定する因子を解明することは、個人の薬物排泄能力に応じた個々の薬物療法へとつながることが期待される。そこで、正常腎組織における種々薬物トランスポータ発現量を測定し症例数を増加させると共に、プロモーター領域の SNP 解析を行った。

本年度はこれまでの集積データに加え合計 109 例の患者について発現量を測定した。その結果、有機アニオントランスポータ群の発現量が最も高く、次いで有機カチオントランスポータ群であった。これ

らのトランスポータ発現量には 100 倍以上の個人差が認められるものの、年齢や性差などとは相関が認められなかった。また、これまでの報告から翻訳領域における終始コドンへの遺伝子変異なども報告されていないことから、これら発現量の個人差には転写制御領域における遺伝子多型が影響する可能性が考えられた。

腎臓に発現する代表的な有機イオントランスポータ (OCT2、OAT1、OAT3、OAT4) のプロモーターの rSNP 解析を行ったところ、OCT2 で上流約 600 bp のプロモーター部位において、3 塩基の欠失する変異が見出された。腎 OCT2 mRNA 発現量や *in vitro* プロモーター解析によって、これらの変異を有すると OCT2 の発現が低下することが示唆された。OCT2 は腎臓における有機カチオン輸送において主要な役割を果たしていることから、今後、解析数を増やすことによって、この変異の発現量に及ぼす影響を精査すると共に、カチオン性薬物の腎排泄における本 SNP の影響について究明していく必要があると考えられる。また、OAT4 においても発現量を増加させる可能性のある SNP が見出された。OAT4 は、OAT1~3 と異なり近位尿細管上皮細胞の刷子縁膜に局在していることから、有機アニオン性薬物の刷子縁膜輸送に重要な役割を果たしていることが示唆されている。この場合もまた、解析数を増やすことによって、この変異の薬物動態学的あるいは生理的意義について究明していく必要があると考えられる。

今回の解析では、OAT1 や OAT3 の発現量に影響を及ぼすと考えられる rSNP は見出されなかった。現在上流 3 kb まで解析領域を増やして、新たな rSNP を検索中である。抗がん剤イリノテカンの代謝に関与する UGT1A1 では、上流-3200 bp 付近に存在する rSNP (T-3263G: UGT1A1\*60) が、UGT1A1 の発現量を低下させることが知られており、上流域における rSNP の探索も近位プロモーターの解析と同様に重要であると考えられる。

## E. 結論

19 種類の腎薬物トランスポータの発現量解析を行ったところ (N=109)、有機アニオントランスポータ群の発現量が最も高く、次いで有機カチオントランスポータ群であり、発現量には最大 100 倍以上の個体差が認められた。腎有機イオントランスポータである OCT2、OAT1、OAT3、OAT4 の rSNP 探索を行ったところ、OCT2 及び OAT4 において発現量に影響を及ぼすと考えられる遺伝子変異を見出した。

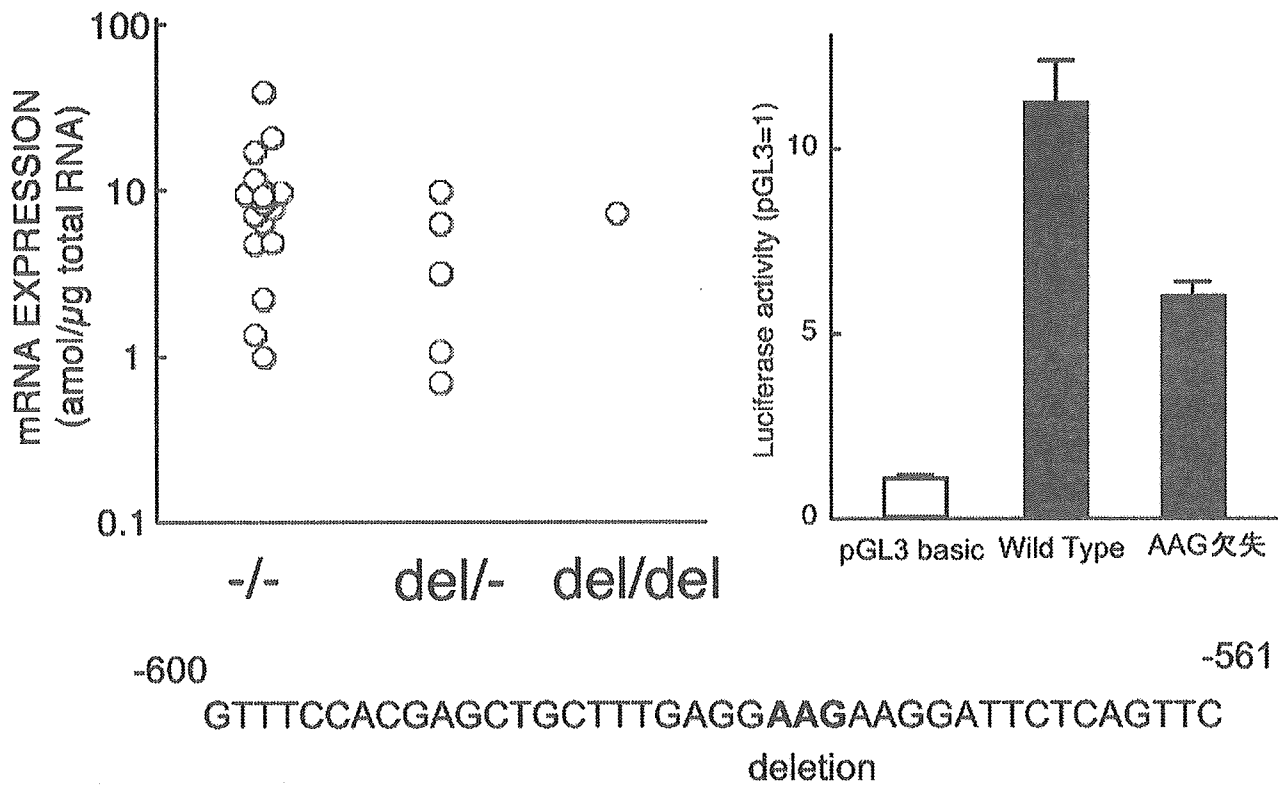


Fig. 1. OCT2 の mRNA 発現量及びプロモーター活性に及ぼす OCT2 プロモーター領域の変異 (-578~-576 位の AAG 欠失) の影響

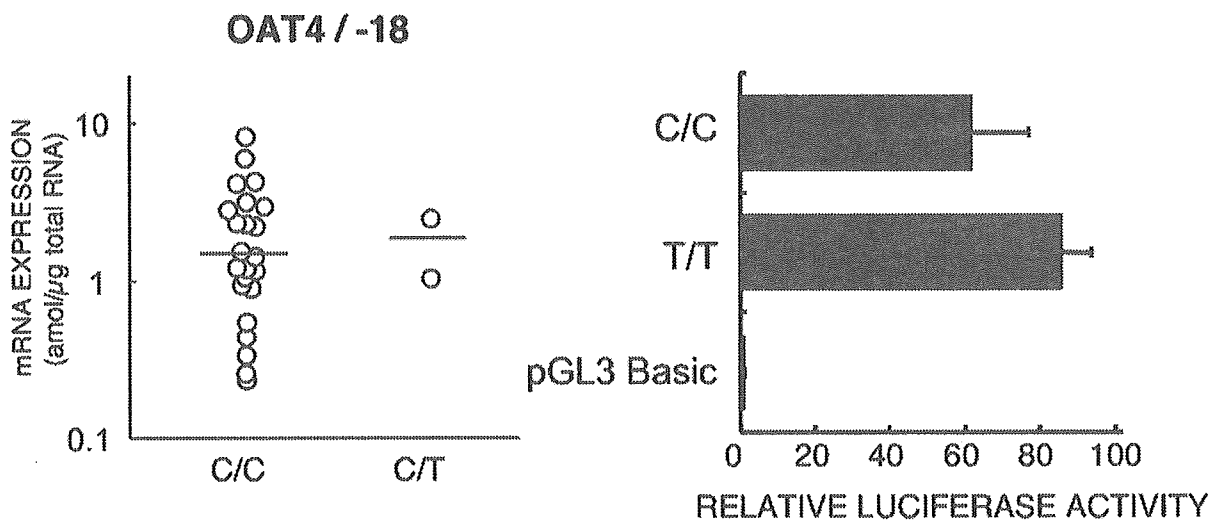


Fig. 2. OAT4 の mRNA 発現量及びプロモーター活性に及ぼす OAT4 rSNP (C-18T) の影響

## 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. Kanematsu, A., Yamamoto, S., Iwai-Kanai, E., Kanatani, I., Imamura, M., Adam, R.M., Tabata, Y. and Ogawa, O.: Induction of smooth muscle cell-like phenotype in marrow-derived cells among regenerating urinary bladder smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.*, **166**(2), 565-573 (2005)
2. Kamoto, T., Isogawa, Y., Shimizu, Y., Minamiguchi, S., Kinoshita, H., Kakehi, Y., Mitsumori, K., Yamamoto, S., Habuchi, T., Kato, T. and Ogawa, O.: Association of a genetic polymorphism of the E-cadherin gene with prostate cancer in a Japanese population. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **35**(3), 158-161 (2005)
3. Okada, Y., Yamamoto, S., Akamatsu, S., Kanamaru, S., Ito, N., Kinoshita, H., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Primary transitional carcinoma of the remaining ureter after nephrectomy for pyonephrosis: a case report. *Hinyokika Kyo*, **51**(2), 101-103 (2005)
4. Matsui, Y., Nishiyama, H., Watanabe, J., Teramukai, S., Ono, Y., Ohshima, S., Fujimoto, K., Hirao, Y., Fukushima, M. and Ogawa, O.: The current status of perioperative chemotherapy for invasive bladder cancer: a multiinstitutional retrospective study in Japan. *Int. J. Clin. Oncol.*, **10**(2), 133-138 (2005)
5. Zhenhua, L., Tsuchiya, N., Narita, S., Inoue, T., Horikawa, Y., Kakinuma, H., Kato, T., Ogawa, O. and Habuchi, T.: CYP3A5 gene polymorphism and risk of prostate cancer in a Japanese population. *Cancer Lett.*, **225**(2), 237-243 (2005)
6. Watanabe, J., Nishiyama, H., Kawanishi, H., Ito, M., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Clinical evaluation of serum p53 antibodies in patients with upper urinary tract tumors. *J. Urol.*, **174**(1), 73-75 (2005)
7. Megumi, Y., Miyauchi, Y., Sakurai, H., Nobeyama, H., Lorick, K., Nakamura, E., Chiba, T., Tanaka, K., Weissman, A.M., Kirisako, T., Ogawa, O. and Iwai, K.: Multiple roles of Rbx1 in the VBC-Cul2 ubiquitin ligase complex. *Genes Cells*, **10**(7), 679-691 (2005)
8. Okinami, T., Yamamoto, S., Yoshida, H., Ito, N., Kamoto, T. and Ogawa, O.: A case of accelerated acute rejection in kidney transplantation rescued by plasma exchange. *Hinyokika Kyo*, **51**(5), 325-329 (2005)
9. Inoue, T., Segawa, T., Shiraishi, T., Yoshida, T., Toda, Y., Yamada, T., Kinukawa, N., Kinoshita, H., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Androgen receptor, Ki67, and p53 expression in radical prostatectomy specimens predict treatment failure in Japanese population. *Urology*, **66**(2), 332-337 (2005)
10. Niu, Z., Ito, M., Awakura, Y., Takahashi, T., Nakamura, E., Ito, N. and Ogawa, O.: The expression of NOV and WT1 in renal cell carcinoma: a quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *J. Urol.*, **174**(4 Pt 1), 1460-1462 (2005)
11. Kanematsu, A., Yamamoto, S., Yoshino, K., Ishitoya, S., Terai, A., Sugita, Y., Ogawa, O. and Tanikaze, S.: Renal scarring is associated with nonsecretion of blood type antigen in children with primary vesicoureteral reflux. *J. Urol.*, **174**(4 Pt 2), 1594-1597
12. Kobayashi, T., Nakamura, E., Ogura, K. and Ogawa, O.: Incidence of adrenal involvement and assessing adrenal function in patients with renal cell carcinoma: is ipsilateral adrenalectomy indispensable during radical nephrectomy? *BJU Int.*, **96**(6), 916 (2005)
13. Higashi, S., Matsui, Y., Takahashi, T., Nishiyama, H., Ito, N., Yamamoto, S., Kamoto, T. and Ogawa, O.: The influence over the long-term prognosis of BCG therapy and the surgical treatment in superficial bladder cancer treatment. *Hinyokika Kyo*, **51**(8), 529-531 (2005)
14. Shioji, G., Ezura, Y., Nakajima, T., Ohgaki, K., Fujiwara, H., Kubota, Y., Ichikawa, T., Inoue, K., Shuin, T., Habuchi, T., Ogawa, O., Nishimura, T. and Emi, M.: Nucleotide variations in genes encoding plasminogen activator inhibitor-2 and serine proteinase inhibitor B10 associated with prostate cancer. *J. Hum. Genet.*, **50**(10), 507-515

- (2005)
15. Kobayashi, T., Kinoshita, H., Nishizawa, K., Mitsumori, K., Ogawa, O. and Kamoto, T.: Age-associated increase of prostate-specific antigen in a high level of men visiting urological clinics. *Int. J. Urol.*, **12**(8), 733-738 (2005)
  16. Segawa, T., Kamoto, T., Kinoshita, H., Kunishima, Y., Yoshimura, K., Ito, A., Takahashi, T., Higashi, S., Nakamura, E., Nishiyama, H., Ito, N., Yamamoto, S., Habuchi, T. and Ogawa, O.: Monthly paclitaxel and carboplatin with oral estramustine phosphate in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Int. J. Clin. Oncol.*, **10**(5), 333-337 (2005)
  17. Yoshida, T., Kinoshita, H., Segawa, T., Nakamura, E., Inoue, T., Shimizu, Y., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Antiandrogen bicalutamide promotes tumor growth in a novel androgen-dependent prostate cancer xenograft model derived from a bicalutamide-treated patient. *Cancer Res.*, **65**(21), 9611-9616 (2005)
  18. Oka, H., Chatani, Y., Kohno, M., Kawakita, M. and Ogawa, O.: Constitutive activation of the 41- and 43-kDa mitogen-activated protein (MAP) kinases in the progression of prostate cancer to an androgen-independent state. *Int. J. Urol.*, **12**(10), 899-905 (2005)
  19. Sawada, A., Segawa, T., Nakanishi, S., Kinoshita, H., Yamamoto, S., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Prostate cancer with penile metastasis: a case report. *Hinyokika Kyo*, **51**(11), 771-773 (2005)
  20. Teramukai, S., Nishiyama, H., Matsui, Y., Ogawa, O. and Fukushima, M.: Evaluation for surrogacy of end points by using data from observational studies: tumor downstaging for evaluating neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer. *Clin. Cancer Res.*, **12**(1), 139-143 (2006)
  21. Ito, M., Nishiyama, H., Watanabe, J., Kawanishi, H., Takahashi, T., Kamoto, T., Habuchi, T. and Ogawa, O.: Association of the PIG3 Promoter Polymorphism with Invasive Bladder Cancer in a Japanese Population. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **36**(2), 116-120 (2006)
  22. Takahashi, T., Higashi, S., Nishiyama, H., Segawa, T., Nakamura, E., Kinoshita, H., Itoh, N., Yamamoto, S., Kamoto, T., Habuchi, T. and Ogawa, O.: Biweekly Paclitaxel and gemcitabine for patients with advanced urothelial cancer ineligible for cisplatin-based regimen. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **36**(2), 104-108 (2006)
  23. Nishizawa, K., Kanno, T., Takahashi, T., Nishiyama, H., Ito, A., Ito, N., Yamamoto, S., Kamoto, T., Ogawa, O., Kotani, H., Adachi, Y., Sakurai, T. and Manabe, T.: A case of retroperitoneal dedifferentiated liposarcoma initially diagnosed as malignant fibrous histiocytoma: a case report. *Hinyokika Kyo*, **52**(1), 11-14 (2005)
  24. Nakamura, E., Abreu-E-Lima, P., Awakura, Y., Inoue, T., Kamoto, T., Ogawa, O., Kotani, H., Manabe, T., Zhang, G.J., Kondo, K., Nose, V. and Kaelin, W.G. Jr.: Clusterin is a secreted marker for a hypoxia-inducible factor-independent function of the von hippel-lindau tumor suppressor protein. *Am. J. Pathol.*, **168**(2), 574-584, 2006
  25. Awakura, Y., Ito, N., Nakamura, E., Takahashi, T., Kotani, H., Mikami, Y., Manabe, T., Kamoto, T., Habuchi, T. and Ogawa, O.: Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms and renal cell carcinoma in a Japanese population. *Cancer Lett.*, in press.
  26. Watanabe, J., Nishiyama, H., Matsui, Y., Ito, M., Kawanishi, H., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Dicoumarol potentiates cisplatin-induced apoptosis mediated by c-Jun N-terminal kinase in p53 wild-type urogenital cancer cell lines. *Oncogene*, in press.
2. 学会発表
1. 中村英二郎、William G. Kaelin、小川 修：細胞培養上清中蛋白質の解析による腎細胞癌新規血清腫瘍マーカーの同定。第93回日本泌尿器科学会総会（2005年4月、東京）
  2. Ito, N., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Running sutures of renal parenchyma with Lapraty in laparoscopic partial nephrectomy. 24th World Congress of Endourology and SWL (August 2005, Amsterdam)
  3. 中村英二郎、川西博晃、栗倉康夫、William G. Kaelin、小川 修：プロテオーム解析による von Hippel-Lindau (VHL) 病の表現型成因の解

明, 第 64 回日本癌学会総会 (2005 年 9 月、札幌)

4. 粟倉康夫, 高橋 毅, 中村英二郎, 伊藤哲之, 小川 修, 門脇正史, 辻本豪三, 秋山英雄, 妙本陽, 信正均: DNA チップを用いた淡明腎細胞癌における予後予測マーカーの探索. 第 64 回日本癌学会総会 (2005 年 9 月、札幌)
5. 伊藤哲之、清川岳彦、西山博之、賀本敏行、小川 修、小山 貴、梅岡成章、玉井 賢: Virtual laparoscopy の試みー標準術式(体腔鏡下腎摘除術)遂行のための術前 simulation. 第 5 回日本 VR 医学会 (2005 年 9 月、東京)
6. Ito, N., Nishiyama, T., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Specimen removal from phannenstiel incision in laparoscopic and retroperitoneoscopic radical nephrectomy. The 2nd Annual Meeting of the East Asaian Society of Endourology (October 2005, Jeju Island, Korea)
7. 伊藤哲之、賀本敏行、小川 修: 鏡視下腎副腎摘除標準術式におけるモニター上の臓器の位置関係のコンセンサス. 第 19 回日本 Endourology・ESWL 学会総会 (2005 年 11 月、東京)
8. 伊藤哲之、西澤恒二、吉村耕治、西山博之、賀本敏行、小川 修: 体腔鏡下腎摘除術の標準術式. 第 18 回日本内視鏡外科学会 (2005 年 12 月、東京)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

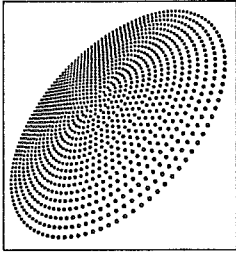
##### 3. その他

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表  
雑誌

発表者の氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Kimura et al.	Metformin transport by renal basolateral organic cation transporter hOCT2.	Pharm. Res.	22(2)	255 -259	2005
Habu et al.	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
Shimizu et al.	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
Irie et al.	Computational modelling of H <sup>+</sup> - coupled peptide transport via human PEPT1.	J. Physiol. (Lond.)	565(2)	429 -439	2005
Urakami et al.	Transcellular transport of creatinine in renal tubular epithelial cell line LLC- PK <sub>1</sub> .	Drug Metab. Pharmacokinet.	20(3)	200 -205	2005
Shimakura et al.	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
Ueo et al.	Human organic anion transporter hOAT3 is a potent transporter of cephalosporin antibiotics, in comparison with hOAT1.	Biochem. Pharmacol.	70(7)	1104 -1113	2005
Kimura et al.	Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1.	Drug Metab. Pharmacokinet.	20(5)	379 -386	2005
Nishio et al.	Modulation of P-glycoprotein expression in hyperthyroid rat tissues.	Drug Metab. Dispos.	33(11)	1584 -1587	2005
Inoue et al.	Regulation of human peptide transporter 1 (PEPT1) in gastric cancer cells by anticancer drugs.	Cancer Lett.	230(1)	72-80	2005
Terada et al.	Expression profiles of various transporters for oligopeptides, amino acids and organic ions along the human digestive tract.	Biochem. Pharmacol.	70(12)	1756 -1763	2005
Yonezawa et al.	Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic	Biochem. Pharmacol.	70(12)	1823 -1831	2005

	cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat.				
Sakurai et al.	Pharmacokinetic significance of renal OAT3 (SLC22A8) for anionic drug elimination in patients with mesangial proliferative glomerulonephritis.	Pharm. Res.	22(12)	2016 -2022	2005
Irie et al.	Prediction of glycylsarcosine transport in Caco-2 cell lines expressing PEPT1 at different levels. in press..	Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.	452(1)	64 -70	2006
Asaka et al.	Androgen receptor is responsible for rat organic cation transporter 2 (rOCT2) gene regulation but not for rOCT1 and rOCT3.	Pharm. Res.	in press		
Shimakura et al.	The transcription factor Cdx2 regulates the intestine-specific expression of human peptide transporter 1 through functional interaction with Sp1.	Biochem. Pharmacol.	in press		
Terada et al.	Molecular cloning, functional chracterization and tissue distribution of rat H <sup>+</sup> /organic cation antiporter MATE1.	Pharm. Res.	in press		
Tsuda et al.	Transport characteristics of a novel PEPT1 substrate, antihypotensive drug midodrine, and its amino acid derivatives.	J. Pharmacol. Exp. Ther.	in press		



# 薬物トランスポーター研究の 現状と将来

寺田智祐\* 乾 賢一\*

## 1. はじめに

薬物トランスポーターは、生体内に投与された薬物の体内動態（吸収・分布・排泄）を制御している膜タンパク質の総称である。栄養物質の摂取に関わるものから、異物の解毒に関わるものまで、多様なトランスポーターが薬物トランスポーターとして機能しており、それぞれが発現臓器や膜局在に応じた薬物動態学的役割を果たしている。ここ10年来、種々薬物トランスポーターの遺伝子クローニングがなされ、それらの役割が分子レベルで明らかになりつつある。

薬物トランスポーターの機能特性を特徴づけるキーワードとして、“diversity (多様性)”と“multispecificity (多選択性)”が挙げられる。すなわち、diversityとは、「一つの薬物トランスポーターファミリーに複数のアイソフォームが存在し、一つの基質が複数のトランスポーターによって輸送される」ことであり、また multispecificityとは、「一つのトランスポーターが複数の基質を輸送する」ことである。このような特徴故に、薬物トランスポーターは比較的少数の分子数で、膨大な数の医薬品の体内動態を制御することが可能になると考えられるが、一

方で、薬物相互作用や、ある薬物の体内動態における各トランスポーターの寄与率同定の困難さの要因にもなっている。

本稿では、薬物トランスポーター研究の現状と課題について概説するとともに、その将来展望について私見を述べてみたい。

## 2. 薬物トランスポーターの分類と薬物動態学的役割

これまで、膜小胞系や培養細胞系を用いた薬物輸送実験により、機能面を中心に分類されてきた薬物輸送系は、現在では単離された遺伝子の塩基配列相同性によって分類されている。すなわち、ABC (ATP binding cassette) トランスポーターファミリー及び溶質トランスポーターファミリー (solute carrier superfamily: SLC) に大きく分けられる。以下に、代表的な4種の薬物トランスポーターについて紹介する (表1)。

### 2.1 ABCトランスポーター (ABCB, ABCC, ABCG)<sup>1-2)</sup>

ABCトランスポーターは、ATPの加水分解エネルギーを利用して細胞内から細胞外への薬物排出を営むトランスポーターであり、このファミリーにはP-糖タンパク質 (Pgp)、multidrug resistance associated protein (MRP) ファミ

\*京都大学医学部附属病院薬剤部



表1 ヒト薬物トランスポーターの分類と薬物動態学的役割

薬物トランスポーター	HGNC名	クローン名	代表的な輸送基質	薬物動態学的役割
<b>ABCトランスポーター</b>				
MDRファミリー	ABCB	Pgpなど	タクロリムス、シクロスポリン、ジゴキシン、バクリタキセルなど	腸管分泌、血液脳関門での機能的障壁、尿細管分泌、胆汁排泄など
MRPファミリー	ABCC	MRP2など	グルクロン酸抱合体、グルタチオン抱合体、メソトレキサートなど	胆汁排泄、腸管分泌、尿細管分泌など
BCRPファミリー	ABCG	BCRP	SN-38、トポテカン、エストロン硫酸など	血液胎盤関門での機能的障壁、腸管分泌、尿細管分泌など
<b>ペプチドトランスポーター</b>				
PEPTファミリー	SLC15A	PEPT1, PEPT2	経口用β-ラクタム抗生物質、バラシクロビル、ACE阻害剤など	腸管吸収、尿細管再吸収など
<b>有機アニオントランスポーター</b>				
OATPファミリー	SLC21A (SLCO)	OATP2 (OATP1B1)など	タウロコール酸、プラバスタチン、エストロン硫酸、甲状腺ホルモンなど	血液中から肝細胞内への取り込みなど
<b>有機イオントランスポーター</b>				
OCTファミリー	SLC22A	OCT1, OCT2など	シメチジン、プロカイナムドなど	尿細管分泌など
OCTNファミリー	SLC22A	OCTN1, OCTN2など	カルニチンなど	尿細管再吸収など
OATファミリー	SLC22A	OAT1, OAT3など	メソトレキサート、非ステロイド性抗炎症薬、利尿薬、抗ウイルス剤など	尿細管分泌など

リー、breast cancer resistance protein (BCRP)などが属している。これらのトランスポーターは、もともと腫瘍細胞から多剤耐性因子として同定されたものであるが、腫瘍組織のみならず正常組織（小腸、肝臓、腎臓、脳など）にも発現し、化学構造や作用機序の異なる多様な薬物（抗癌剤、免疫抑制剤、強心配糖体など）を輸送している。Pgpは中性・カチオン性の高脂溶性薬物を代表的基質とするのに対して、MRPファミリーはアニオン性の高脂溶性薬物を代表的基質とする。またBCRPはPgpやMRPと異なり、ATP結合領域を1つしか持たない6回膜貫通型の構造を有している。当初、MDR1と類似の基質特異性をもつと考えられてきたが、最近になって多くの硫酸抱合体をはじめとするアニオン性化合物も輸送することが報告されている。

## 2.2 ペプチドトランスポーター (SLC15)<sup>3)</sup>

ペプチドトランスポーターには、PEPT1とPEPT2の2つのアイソフォームが存在する。両トランスポーターは、H<sup>+</sup>勾配を駆動力とし

て、小分子ペプチド（ジペプチドやトリペプチド）や経口用β-ラクタム抗生物質などペプチド類似薬物を認識し輸送する。両トランスポーターの基質に対する親和性は大きく異なり、PEPT1が低親和性型、またPEPT2が高親和性型ペプチドトランスポーターとして機能している。PEPT1は主に小腸の刷子縁膜に、またPEPT2は主に腎臓の刷子縁膜に発現し、ペプチド類似薬物の腸管吸収や腎再吸収に参与している。近年、両トランスポーターはペプチド結合を持たない化合物をも輸送することが示され、薬物送達システムの標的分子としても注目されている。

## 2.3 有機アニオントランスポーター (SLC21)<sup>4)</sup>

有機アニオントランスポーター (OATPファミリー) には、ヒトを含めた各動物種から約20クローンが単離されているが、それぞれカウンターパートになり得ないクローンも多く、他の薬物トランスポーターに比べて種差の大きなファミリーである。OATPファミリーは、

胆汁酸、抱合型ビリルビン、甲状腺ホルモンや高脂血症治療薬プラバスタチンなど脂溶性の高い有機アニオン性化合物を基質とする。OATPファミリーの多くは、主に肝細胞の血管側側底膜に局在し、アニオン性薬物の血管側から肝細胞取り込みを媒介している。

## 2.4 有機イオントランスポーター (SLC22)<sup>5)</sup>

有機イオントランスポーターには、有機カチオントランスポーター (OCT/OCTN) ファミリー、有機アニオントランスポーター (OAT) ファミリーが存在する。

OCTにはOCT1からOCT3のアイソフォームがあり、腎臓、肝臓、胎盤などに発現している。腎臓では尿管上皮細胞の側底膜に局在し、細胞内負の膜電位を駆動力として、有機カチオン性薬物 (シメチジン、プロカインアミドなど) の血液から尿管上皮細胞内への取り込み過程を媒介している。最近我々は、糸球体濾過速度マーカーとして臨床的に用いられているクレアチニンが、OCT2を介して輸送されることを明らかにした (Km値=4.0 mM)<sup>6)</sup>。従って、カチオン性薬物の併用により、OCT2を介したクレアチニン輸送が阻害され、血清クレアチニンの上昇やクレアチンクリアランスの低下を招き、腎機能を過小評価する危険性があると考えられる。OCTNにはOCTN1からOCTN3が存在し、腎臓、小腸、精巣などにおけるカルニチン輸送を営んでいる。特にヒトOCTN2遺伝子は、遺伝性全身カルニチン欠乏症の原因遺伝子として同定されている<sup>7)</sup>。

OATにはOAT1からOAT4のアイソフォームがあり、腎臓において有機アニオン性薬物 (メソトレキサート、セフェム系抗生物質など) の尿管分泌を媒介している。しかし、OAT3はシメチジンやファモチジンなどカチオン性薬物をも輸送することから、その基質認識機序としては、単に薬物の荷電状態を認識しているものではないと推察される。

## 3. 薬物トランスポーターの臨床研究

多くの薬物トランスポーター遺伝子が単離されて以来、各トランスポーターの臓器分布、

膜局在性、基質認識特性など基本的な情報が集積し、現在ではこれらの情報を基にした臨床研究が展開されつつある。そこで、薬物トランスポーターの臨床研究に焦点を当て、現況を紹介する。

### 3.1 薬物トランスポーターの遺伝子多型

いくつかの薬効関連分子や薬物代謝酵素においては、genotypingに基づいた個別化薬物治療が臨床の現場において浸透しつつある。これらは主に、アミノ酸変異をもたらずコーディング領域の一塩基多型 (cSNP) 情報を利用した治療戦略であり、標的遺伝子の機能変化と臨床効果は良い相関を示すことから、現在ゲノム情報に基づいたテーラーメイド薬物療法の大きな柱になりつつある。

薬物トランスポーターのcSNP解析も盛んに行われ、いくつかのトランスポーターについては輸送機能の変動する例が報告されている<sup>8,9)</sup>。しかし、薬物トランスポーター群に関しては、機能変化をもたらずcSNPの発現頻度は非常に低く、cSNPが個体間変動因子になりうる可能性は低いことが明らかになりつつある。一方、最近注目されているのがプロモーター領域のSNP (regulatory SNP: rSNP) やイントロン部位のSNP (intronic SNP: iSNP) である。MDR1のrSNPについて解析がなされ、いくつかのSNPがハプロタイプを形成し、MDR1 mRNA発現量に影響を及ぼすことが示されている<sup>10,11)</sup>。さらに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<sup>12)</sup> や、SLC22A5 (OCTN2) のrSNPがOCTN2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<sup>13)</sup> が報告されている。今後、薬物トランスポーターのSNPを薬物動態個体間変動因子としてとらえる場合には、rSNPやiSNPの解析とその発現量や輸送機能に及ぼす影響を調べていく必要があると考えられる。

### 3.2 薬物トランスポーターの発現量

薬物体内動態の個体間変動因子として、遺伝子多型の他に薬物トランスポーター発現量の個体差が挙げられる。実際、実験動物を用いて薬物トランスポーターの発現変動と基質薬物の体内動態変動の関係が検討され、両者

の間に良好な相関が示されている<sup>14,15)</sup>。一方、ヒトでは薬物体内動態の解析と同時に組織検体を得ることが困難であるため、特殊な条件下でしかそのような解析は出来ないが、手術時あるいは生検により採取した組織の余剰分を用いた解析が報告されつつある。以下に我々の研究成果を紹介する。

生体肝移植患者の小腸組織におけるMDR1 mRNA発現には個体間で約100倍の違いが認められ、術後7日間における免疫抑制剤タクロリムスの血中濃度/投与量の比とMDR1 mRNA発現量との間に良好な逆相関があることを見出した<sup>16)</sup>。これは、小腸MDR1 mRNA発現量が、タクロリムスの吸収動態を規定する重要な因子であることを定量的に実証したものであり、現在、個別化免疫抑制療法の確立に活用している。また、腎生検が施行された腎疾患患者について、腎組織における有機アニオントランスポーター(OAT1-4)のmRNA量を測定し、感染症予防のために投与されたアニオン性抗生物質セファゾリンの腎排泄速度との相関について解析した。その結果、OAT3 mRNA発現量のみがセファゾリンの消失速度定数と有意な相関を示し、OAT3 mRNA発現量が薬物腎排泄速度の規定因子であることを明らかにした<sup>17)</sup>。今後の課題として、血液や尿サンプルなどを用いて非侵襲的に薬物トランスポーターの発現量を予測できるシステムの構築が望まれる。

### 3.3 薬物トランスポーターを介した薬物相互作用

薬物トランスポーターを介した薬物相互作用の典型的な例として、同一のトランスポーターを介した基質同士の競合阻害が挙げられる。例えば、抗癌剤メソトレキサートと非ステロイド抗炎症薬の併用により、メソトレキサートの血中濃度が上昇し致死的な副作用を起こすことが古くより知られているが、有機アニオントランスポーターOAT1やOAT3が、これら薬物間の相互作用部位であることが示されている<sup>18)</sup>。

一方、高脂血症治療薬セリバスタチンの血中濃度が、免疫抑制剤シクロスポリンAの併用によって上昇したことが報告されている<sup>19)</sup>。このメカニズムとして、OATP1B1 (OATP2/OATP-C/LST-1) を介したセリバスタチンの肝取り込

みが、シクロスポリンAによって阻害されたためと考えられている<sup>20)</sup>。シクロスポリンAはOATP1B1の基質になるとの報告はないことから、メソトレキサートと非ステロイド抗炎症薬の様な単純な競合阻害とは異なり、薬物相互作用を予測することは困難であろう。

リファンピンの投与によってヒト十二指腸におけるPgpの発現が誘導され、その発現量と経口投与後のジゴキシンのAUCが逆相関を示すことが報告されている<sup>21)</sup>。その機序としては、核内レセプターPXRを介したものであることが知られている<sup>22)</sup>。健康食品のセントジョーンズ・ワート<sup>23)</sup> や抗けいれん薬カルバマゼピン<sup>24)</sup> も同様の機序によって小腸のPgpを誘導することが示されており、新しい薬物相互作用のメカニズムとして注意する必要がある。

### 3.4 薬物トランスポーターを利用したDDS

小腸に発現するPEPT1は、ペプチド結合を持たない化合物をも輸送することが見出され、難吸収性薬物の吸収改善を目指したDDSへの応用が注目されている。例えば、valacyclovirは抗ウイルス薬acyclovirの経口吸収性を改善するために開発されたプロドラッグであり、acyclovirにバリンをエステル結合させた構造を有している。Acyclovirは1日5回の経口投与が必要であったが、valacyclovirはPEPT1によって良好に輸送される<sup>25)</sup> ため、1日2-3回の経口投与で十分な血中濃度が得られている。この様に、PEPT1のDDS標的分子としての有用性が臨床的にも実証され、今後も同様の戦略に基づく難吸収性薬物のプロドラッグ開発が期待されるであろう。

## 4. 薬物トランスポーター研究の今後の課題

図1に、薬物トランスポーター基礎研究における未解明の問題を挙げた。以下に個々の点について解説する。

### 4.1 未同定薬物トランスポーターの遺伝子クローニング

膜小胞系や培養細胞系を用いた検討により、機能的な重要性は明確でありながらも、未だそ

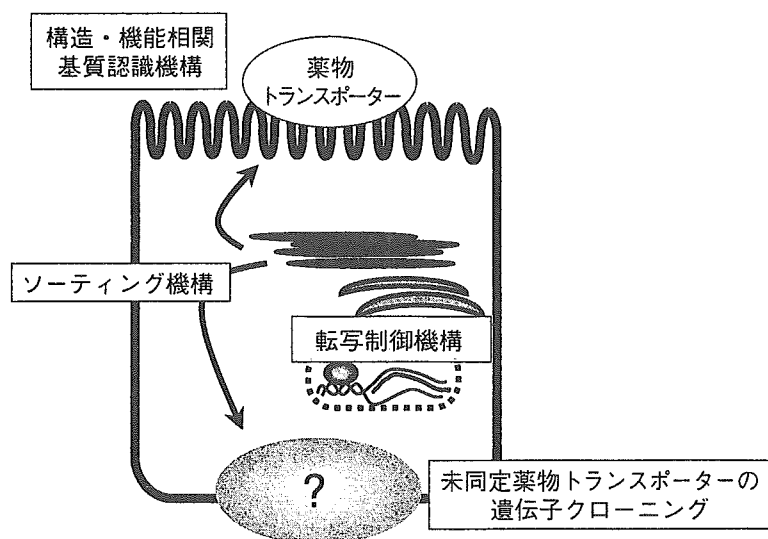


図1 薬物トランスポーター基礎研究における課題

の分子実体が不明の薬物トランスポーターが存在する。例えば、近位尿細管上皮細胞の刷子縁膜に局在する、 $H^+$ /有機カチオンアンチporterや膜電位依存型有機アニオントランスポーター、あるいは小腸上皮細胞の側底膜に発現する側底膜型ペプチドトランスポーターなどである。通常の発現クローニングでは単離が困難と思われるトランスポーターが幾つか残されている感があり、これらの遺伝子クローニングのためには更なる工夫が必要である。

#### 4.2 薬物トランスポーターの転写制御機構

多くの薬物トランスポーターの活性がホルモン、サイトカイン、薬物、さらに各種疾患など様々な条件によって調節を受けることが報告されている。しかし多くの報告は、トランスポーター活性変動がmRNAの増加あるいは減少に基づくといった現象面の解析に終始しており、様々な細胞外のシグナルがどのようにトランスポーター遺伝子の転写を制御しているのか、どのような転写因子がトランスポーターの発現制御に関与しているのかといった解析は乏しいのが現状である。肝臓に発現するOATPファミリーやMRPファミリーについては比較的研究が進んでいることから<sup>26)</sup>、これらの研究を参考に、小腸、腎臓、脳などに発現する薬物トランスポーターの転写制御機構に関する解析が進展することが望まれる。

#### 4.3 薬物トランスポーターのソーティング機構

薬物トランスポーターは臓器特異的な極性分布を示すことによって、上皮細胞における方向選択的な薬物輸送を規定している。薬物トランスポーターのソーティング機構や細胞膜局在化機構については不明の点が多かったが、近年、遺伝子欠損動物やyeast two-hybridシステムを用いた解析により新たな情報が集積しつつある。例えば、細胞膜裏打ちタンパクの一つであるラディキシンのノックアウトマウスを用いた解析より、MRP2の肝胆管側膜における発現が減少することが明らかにされている<sup>27)</sup>。また、PDZタンパクの一つであるPDZK1は、尿酸トランスポーターURAT1<sup>28)</sup>やカルニチントランスポーターOCTN2<sup>29)</sup>とC末端部位で相互作用し、これらトランスポーターの腎尿細管刷子縁膜における安定性に関与している可能性が示されている。しかし、PDZK1ノックアウトマウスでは、PDZK1との相互作用が既に報告されているMRP2や $Na^+$ 駆動型リン酸トランスポーターの膜局在には何ら変動が認められなかったことから<sup>30)</sup>、その生理的意義については更なる検討が必要と考えられる。

#### 4.4 薬物トランスポーターの構造・機能相関と基質認識機構

部位特異的変異トランスポーターやインフォーム間でのキメラトランスポーターを用いた薬物輸送実験によって、薬物トランスポー

ターの基質結合部位あるいは輸送制御部位などが徐々に明らかにされてきている。しかし、薬物トランスポーターが膨大な数の薬物をどのように認識し、如何に膜輸送を媒介しているのかといった基本的な疑問にはほとんど答えられていない。最近、大腸菌のlactose permeaseの結晶構造を基に、rOCT1の3次元モデルが提唱され、その基質認識領域には複数の基質や阻害剤が同時に結合しうることが示されている<sup>31)</sup>。高い基質特異性を示す酵素などでは、鍵と鍵穴のような厳格な結合様式が示されているが、rOCT1にみられるようなファジーな基質選択性が薬物トランスポーターのmultispecificityを規定している要因かもしれない。薬物トランスポーターの結晶解析に基づいた、薬物認識並びに輸送機序の解明は、動態特性を考慮した創薬開発につながるであろう。

## 5. おわりに

この10年間に薬物トランスポーターの実体解明が急速に進展し、各トランスポーターの情報についてはある程度整理されてきた。今後は、上述した課題の解決とともに、得られた情報をインテグレートすることによって、*in vivo*における各トランスポーターの薬物動態学的役割がより明確になることが期待される。また、「医薬品の適正使用」並びに「創薬」を指向した応用研究が今後一段と加速されることが予想されるが、異分野におけるさまざまなコンセプトや技術を積極的に取り込んで、薬物トランスポーター研究が学際的に大きく展開していくことを期待したい。

## ■文献

- 1) Kimura Y, Matsuo M, Takahashi K, Saeki T, Kioka N, Amachi T, Ueda K: ATP hydrolysis-dependent multidrug efflux transporter: MDR1/P-glycoprotein, *Curr Drug Metab*, **5**: 1-10, 2004.
- 2) Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SP: The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation, *Curr Drug Metab*, **5**: 21-53, 2004.
- 3) Terada T, Inui K: Peptide transporters: structure, function, regulation and application for drug delivery, *Curr Drug Metab*, **5**: 85-94, 2004.
- 4) Mikkaichi T, Suzuki T, Tanemoto M, Ito S, Abe T: The organic anion transporter (OATP) family, *Drug Metab Pharmacokinet*, **19**: 171-179, 2004.
- 5) Inui K, Masuda S, Saito H: Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney, *Kidney Int*, **58**: 944-958, 2000.
- 6) Urakami Y, Kimura N, Okuda M, Inui K: Creatinine transport by basolateral organic cation transporter hOCT2 in the human kidney, *Pharm Res*, **21**: 976-981, 2004.
- 7) Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, Nikaido H, Sai Y, Koizumi A, Shoji Y, Takada G, Matsuishi T, Yoshino M, Kato H, Ohura T, Tsujimoto G, Hayakawa J, Shimane M, Tsuji A: Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter, *Nature Genet*, **21**, 91-94: 1999.
- 8) Takeuchi A, Motohashi H, Okuda M, Inui K: Decreased function of genetic variants, Pro283Leu and Arg287Gly, in human organic cation transporter *hOCT1*, *Drug Metab Pharmacokinet*, **18**: 409-412, 2003.
- 9) Terada T, Irie M, Okuda M, Inui K: Genetic variant Arg57His in human H<sup>+</sup>/peptide cotransporter 2 causes a complete loss of transport function, *Biochem Biophys Res Commun*, **316**: 416-420, 2004.
- 10) Taniguchi S, Mochida Y, Uchiumi T, Tahira T, Hayashi K, Takagi K, Shimada M, Maehara Y, Kuwano H, Kono S, Nakano H, Kuwano M, Wada M: Genetic polymorphism at the 5' regulatory region of multidrug resistance 1 (MDR1) and its association with interindividual variation of expression level in the colon, *Mol Cancer Ther*, **2**: 1351-1359, 2003.
- 11) Takane H, Kobayashi D, Hirota T, Kigawa J, Terakawa N, Otsubo K, Ieiri I: Haplotype-oriented genetic analysis and functional assessment of promoter variants in the MDR1 (ABCB1) gene, *J Pharmacol Exp Ther*, **311**: 1179-1187, 2004.
- 12) Tokuhiko S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Ohtsuki M, Ono M, Furukawa H, Nagashima M: An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis, *Nature Genet*, **35**: 341-348, 2003.
- 13) Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon

- D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovich KA: Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease, *Nature Genet*, **36**: 471-475, 2004.
- 14) Ji L, Masuda S, Saito H, Inui K: Down-regulation of rat organic cation transporter rOCT2 by 5/6 nephrectomy, *Kidney Int*, **16**: 514-524, 2002.
  - 15) Habu Y, Yano I, Okuda M, Fukatsu A, Inui K: Restored expression and activity of organic ion transporters rOAT1, rOAT3 and rOCT2 after hyperuricemia in the rat kidney, *Biochem Pharmacol*, in press, 2005.
  - 16) Hashida T, Masuda S, Uemoto S, Saito H, Tanaka K, Inui K: Pharmacokinetic and prognostic significance of intestinal MDR1 expression in recipients of living-donor liver transplantation. *Clin Pharmacol Ther*, **69**: 308-316, 2001.
  - 17) Sakurai Y, Motohashi H, Ueo H, Masuda S, Saito H, Okuda M, Mori N, Matsuura M, Doi T, Fukatsu A, Ogawa O, 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**: 61-67, 2004.
  - 18) Uwai Y, Taniguchi R, Motohashi H, Saito H, Okuda M, Inui K: Methotrexate-loxoprofen interaction: involvement of human organic anion transporters hOAT1 and hOAT3, *Drug Metab Pharmacokinet*, **19**: 369-374, 2004.
  - 19) Muck W, Mai I, Fritsche L, Ochmann K, Rohde G, Unger S, Johne A, Bauer S, Budde K, Roots I, Neumayer HH, Kuhlmann J: Increase in cerivastatin systemic exposure after single and multiple dosing in cyclosporin-treated kidney transplant recipients, *Clin Pharmacol Ther*, **65**: 251-261, 1999.
  - 20) Shitara Y, Hirano M, Adachi Y, Itoh T, Sato H, Sugiyama Y: In vitro and in vivo correlation of the inhibitory effect of cyclosporin A on the transporter-mediated hepatic uptake of cerivastatin in rat, *Drug Metab Dispos*, **32**: 1468-1475, 2004.
  - 21) Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK: The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin, *J Clin Invest*, **104**: 147-153, 1999.
  - 22) Geick A, Eichelbaum M, Burk O: Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin, *J Biol Chem*, **276**: 14581-14587, 2001.
  - 23) Durr D, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Rentsch KM, Steinert HC, Meier PJ, Fattinger K: St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4, *Clin Pharmacol Ther*, **68**: 598-604, 2000.
  - 24) Giessmann T, May K, Modess C, Wegner D, Hecker U, Zschiesche M, Dazert P, Grube M, Schroeder E, Warzok R, Cascorbi I, Kroemer HK, Siegmund W: Carbamazepine regulates intestinal P-glycoprotein and multidrug resistance protein MRP2 and influences disposition of talinolol in humans, *Clin Pharmacol Ther*, **76**: 192-200, 2004.
  - 25) Han H, de Vroeh RL, Rhie JK, Covitz KM, Smith PL, Lee CP, Oh DM, Sadee W, Amidon GL: 5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter, *Pharm Res*, **15**: 1154-1159, 1998.
  - 26) 青木公子、設楽悦久、佐藤 均、杉山雄一：薬物動態を制御するトランスポーター、発現ならびに機能制御の機構-転写過程での調節、*Molecular Medicine*, **42**: 90-99, 2005.
  - 27) Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K, Yamane Y, Matsui T, Tamura A, Yonemura S, Yamagishi H, Keppler Tsukita S, Tsukita S: Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes, *Nature Genet*, **31**: 320-325, 2002.
  - 28) Anzai N, Miyazaki H, Noshiro R, Khamdang S, Chairoungdua A, Shin HJ, Enomoto A, Sakamoto S, Hirata T, Tomita K, Kanai Y, Endou H: The multivalent PDZ domain-containing protein PDZK1 regulates transport activity of renal urate-anion exchanger URAT1 via its C terminus, *J Biol Chem*, **279**: 45942-45950, 2004.
  - 29) Kato Y, Sai Y, Yoshida K, Watanabe C, Hirata T, Tsuji A: PDZK1 directly regulates the function of organic cation/carnitine transporter OCTN2, *Mol Pharmacol*, **67**: 734-743, 2005.
  - 30) Kocher O, Pal R, Roberts M, Cirovic C, Gilchrist A: Targeted disruption of the PDZK1 gene by homologous recombination, *Mol Cell Biol*, **23**: 1175-1180, 2003.
  - 31) Popp C, Gorboulev V, Muller T, Gorbunov D, Shatskaya N, Koepsell H: Amino acids critical for substrate affinity of rat organic cation transporter 1 line the substrate binding region in a model derived from the tertiary structure of lactose permease, *Mol Pharmacol*, in press, 2005.

---

### Present Status and Future Perspective of Drug Transporters

Tomohiro Terada\*, Ken-ichi Inui\*

\*Department of Pharmacy, Kyoto University Hospital

## Research Paper

# Metformin Transport by Renal Basolateral Organic Cation Transporter hOCT2

Naoko Kimura,<sup>1</sup> Masahiro Okuda,<sup>1</sup> and Ken-ichi Inui<sup>1,2</sup>

Received September 2, 2004; accepted October 22, 2004

**Purpose.** Metformin, an antihyperglycemic agent, is eliminated by tubular secretion in addition to glomerular filtration in the human kidney. This study was performed to characterize metformin transport by human organic cation transporter 2 (hOCT2), the most abundant organic cation transporter in the basolateral membranes of the human kidney.

**Methods.** Accumulation of [<sup>14</sup>C]metformin was assessed by the tracer experiments in the human embryonic kidney (HEK293) cells expressing hOCT2.

**Results.** The transport of [<sup>14</sup>C]metformin was markedly stimulated in hOCT2-expressing cells compared with the vector-transfected cells. The accumulation of [<sup>14</sup>C]metformin was concentrative and was dependent on the membrane potential, showing consistency with the characteristics of hOCT2. The apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  values of [<sup>14</sup>C]metformin transport by hOCT2-expressing HEK293 cells were  $1.38 \pm 0.21$  mM and  $11.9 \pm 1.5$  nmol mg protein<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, respectively. The order of the potencies of unlabeled biguanides to inhibit [<sup>14</sup>C]metformin transport by hOCT2 was phenformin > buformin > metformin. Furthermore, [<sup>14</sup>C]metformin transport was inhibited slightly or moderately by cationic drugs such as procainamide and quinidine at respective therapeutic concentrations.

**Conclusions.** Metformin is transported by the basolateral organic cation transporter hOCT2 in the human kidney. hOCT2 could play a role in the drug interactions between metformin and some cationic drugs.

**KEY WORDS:** hOCT2; human kidney; metformin; organic cation transporter; renal tubular secretion.

## INTRODUCTION

Biguanide agents have been used for the treatment of type 2 diabetes mellitus since the late 1950s. These drugs are useful in primary therapy for type 2 diabetes mellitus with obesity or hyperlipidemia and can also be used for add-on therapy in patients with diabetes uncontrolled by sulfonylureas and diet (1–2). The mechanisms of the pharmacological action of metformin involve the decreased hepatic glucose production without an effect on the release of insulin and the increased glycogenesis and lactate production. The most life-threatening adverse effect of biguanides is lactic acidosis, because there is a risk of overproduction of lactate through inhibition of mitochondrial respiration and increased anaerobic glycolysis (1). A risk of decreased use of lactate through inhibition of gluconeogenesis by biguanides has been also documented (1). Although phenformin was removed from the market because of its association with lactic acidosis, the relative risk is much lower for metformin than for phenfor-

min. Moreover, the risk of lactic acidosis caused by metformin is less than the risk of severe hypoglycemia induced by sulfonylurea drugs (3).

Metformin is mainly excreted into urine, almost entirely in an unchanged form. The renal clearance of metformin (440–454 ml/min) is much higher than the glomerular filtration rate in humans (4–5), suggesting a significant contribution of tubular secretion in addition to glomerular filtration. As biguanides consist of two molecules of guanidine linked together by the removal of an ammonia group, they are protonated at physiologic pH. Organic cation transporters have been suggested to mediate tubular secretion of metformin (6–7); however, the molecular mechanisms underlying the renal tubular secretion of biguanides have not been clarified.

Organic cation transporters in the kidney, liver, intestine, brain, and placenta play essential physiologic and pharmacological roles in the handling of cationic drugs and endogenous organic ions. Human organic cation transporter 1 (hOCT1) is expressed primarily in the liver (8–9) and is likely responsible for the hepatic uptake of various cationic drugs. In contrast to hOCT1, we demonstrated that human organic cation transporter 2 (hOCT2) is the most abundant organic cation transporter in the basolateral membranes of human kidney (10). Moreover, hOCT2 as well as its orthologue in the rat (rOCT2) were localized at the basolateral membranes of renal proximal tubules and were suggested to contribute to the secretion of organic cations, such as tetraethylammonium,

<sup>1</sup> Department of Pharmacy, Kyoto University Hospital, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. (E-mail: inui@kuhp.kyoto-u.ac.jp)

**ABBREVIATIONS:** hOCT1, human organic cation transporter 1; hOCT2, human organic cation transporter 2; rOCT1, rat organic cation transporter 1; HEPES, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid.

1-methyl-4-phenylpyridinium, cimetidine, and guanidine (10–13). Recently, rat (r) OCT1 as well as mouse (m) OCT1 was revealed to transport biguanides (14,15). It was also demonstrated that tissue distribution of metformin was decreased in the liver, duodenum, jejunum, ileum, but not in the kidney and colon, in the mOCT1 gene-knockout mice. Moreover, Dresser *et al.* (16) reported that metformin and phenformin induced currents and *trans*-stimulated [<sup>3</sup>H]1-methyl-4-phenylpyridinium uptake in *Xenopus* oocytes expressing hOCT1 and hOCT2. However, information has been limited regarding the characteristics of metformin transport by hOCT2 and hOCT2-mediated drug interactions between metformin and concomitantly administered drugs. In the current study, we characterized the transport of [<sup>14</sup>C]metformin using human embryonic kidney (HEK293) cells stably expressing hOCT2. We also assessed drug interactions between [<sup>14</sup>C]metformin and various cationic drugs.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

[Biguanidine-<sup>14</sup>C]metformin hydrochloride (26 mCi/mmol) was purchased from Moravak Biochemicals, Inc. (Brea, CA, USA). [Ethyl-<sup>14</sup>C]tetraethylammonium bromide (55 mCi/mmol) was purchased from American Radio-labeled Chemicals (St. Louis, MO, USA). Metformin, phenformin, and 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide were obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Buformin was purchased from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan). Tetraethylammonium bromide and cimetidine were obtained from Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan). All other compounds used were of the highest purity available.

### Cell Culture and Transfection

To construct the transfectant stably expressing hOCT2, HEK 293 cells (ATCC CRL-1573, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), a transformed cell line derived from human embryonic kidney, were transfected with 0.8 µg of total plasmid DNA (pCMV-XL4:pBK-CMV vector = 2:1) per well. At 24 h after transfection, the cells split between 1:15 and 1:30 were cultured in complete medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37°C containing G418 (0.5 mg/ml) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). Then, 14 to 21 days after transfection, single colonies were selected. G418-resistant colonies were analyzed by RT-PCR for expression of hOCT2 mRNA (17).

For uptake experiments, the cells were seeded onto poly-D-lysine-coated 24-well plates at a density of  $2.0 \times 10^5$  cells per well. The cell monolayers were used at day 3 of culture for uptake experiments. In this study, HEK293 cells between passages 70 and 83 were used.

### Uptake Experiments

Cellular uptake of cationic compounds was measured with monolayer cultures of HEK293 cells grown on poly-D-lysine-coated 24-well plates (17). The incubation medium for uptake experiments contained 145 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM D-glucose, and 5 mM

HEPES (pH 7.4). The composition of the high K<sup>+</sup> incubation medium was 3 mM NaCl, 145 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM D-glucose, and 5 mM HEPES (pH 7.4). When indicated, 9.2 mM BaCl<sub>2</sub> was added to the incubation medium. The pH of the medium was adjusted with NaOH or HCl. The cells were preincubated with 0.2 ml of incubation medium for 10 min at 37°C. The medium was then removed, and 0.2 ml of incubation medium containing [<sup>14</sup>C]metformin or [<sup>14</sup>C]tetraethylammonium was added. The medium was aspirated off at the end of the incubation, and the monolayers were rapidly rinsed twice with 1 ml of ice-cold incubation medium. The cells were solubilized in 0.5 ml of 0.5 N NaOH, and then the radioactivity in aliquots was determined by liquid scintillation counting. The protein content of the solubilized cells was determined by the method of Bradford (18), using a Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with bovine γ-globulin as a standard. The concentration dependence of metformin transport by hOCT2 was analyzed using the Michaelis-Menten equation;  $V = V_{\max} \cdot [S]/(K_m + [S]) + K_d \cdot [S]$ , where V is the transport rate,  $V_{\max}$  is the maximum transport rate, [S] is the concentration of metformin,  $K_m$  is the Michaelis constant, and  $K_d$  is a diffusion constant. For the *cis*-inhibition study, the uptake of [<sup>14</sup>C]metformin was achieved by adding various concentrations of unlabeled inhibitors to the incubation medium. The IC<sub>50</sub> values were calculated from the inhibition plots based on the equation,  $V = V_0/[1 + (I/IC_{50})^n]$  by nonlinear least square regression analysis with Kaleidagraph Version 3.5 (Synergy Software, Reading, PA, USA) (12). V and V<sub>0</sub> are the uptake rates of [<sup>14</sup>C]metformin in the presence and absence of inhibitor, respectively. I is the concentration of inhibitor, and n is the Hill coefficient.

### Statistical Analyses

Data were analyzed statistically by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test. p values of less than 0.05 were considered to be significant.

## RESULTS

### Concentration Dependence of [<sup>14</sup>C]Metformin Transport by hOCT2

To examine whether metformin is transported by hOCT2, we evaluated the uptake of [<sup>14</sup>C]metformin by HEK293 cells stably expressing hOCT2. Figure 1 illustrates the time-course of [<sup>14</sup>C]metformin uptake by HEK 293 cells transfected with hOCT2 and empty vector (Fig. 1). The uptake of [<sup>14</sup>C]metformin increased time-dependently, and was linear for up to 2 min. Figure 2 shows the concentration dependence of [<sup>14</sup>C]metformin uptake by hOCT2-expressing cells. The uptake of [<sup>14</sup>C]metformin by these cells was saturated at high concentrations. The apparent Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) value of [<sup>14</sup>C]metformin uptake by hOCT2-transfected cells, estimated by subtracting the nonsaturable component of [<sup>14</sup>C]metformin transport in the presence of 1-methyl-4-phenylpyridinium (5 mM) was  $1.38 \pm 0.21$  mM. The maximal uptake rate ( $V_{\max}$ ) value of the [<sup>14</sup>C]metformin uptake by hOCT2-transfected cells was  $11.9 \pm 1.5$  nmol mg protein<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (mean ± SE of three separate experiments using three monolayers).



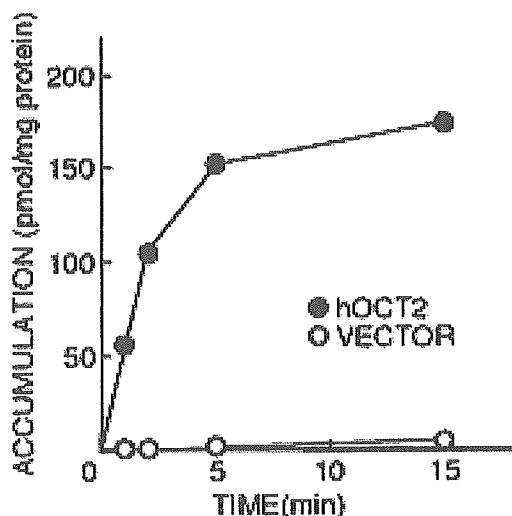


Fig. 1. Time course of [ $^{14}\text{C}$ ]metformin uptake by HEK293 cells stably expressing hOCT2. HEK 293 cells transfected with hOCT2 (●) or pCMV6-XL4 vector (○) were incubated for the specified periods (1, 2, 5, and 15 min) at 37°C with 0.2 ml of 10  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]metformin (pH 7.4). Each point represents the mean  $\pm$  SE of three monolayers from a typical experiment.

#### Effect of Membrane Potential on the Transport of [ $^{14}\text{C}$ ]Metformin and [ $^{14}\text{C}$ ]Tetraethylammonium by hOCT2

Next, we examined the effect of membrane potential on the accumulation of [ $^{14}\text{C}$ ]metformin and [ $^{14}\text{C}$ ]tetraethylammonium in HEK293 cells expressing hOCT2 (Fig. 3). The accumulation of [ $^{14}\text{C}$ ]metformin in hOCT2-expressing cells decreased in the presence of high  $\text{K}^+$  (145 mM) medium (Fig. 3A) similarly as observed for [ $^{14}\text{C}$ ]tetraethylammonium (Fig. 3B). Furthermore, the accumulation of [ $^{14}\text{C}$ ]metformin and [ $^{14}\text{C}$ ]tetraethylammonium *via* hOCT2 decreased in the presence of  $\text{Ba}^{2+}$  (9.2 mM), a nonselective blocker of  $\text{K}^+$  channels. The mean percent of control values  $\pm$  SE of [ $^{14}\text{C}$ ]metformin accumulation obtained from three separate experiments using three monolayers were  $24.8 \pm 2.8\%$  and  $59.0 \pm 9.9\%$  for high  $\text{K}^+$  and  $\text{Ba}^{2+}$  media, respectively ( $p < 0.01$  vs. control). The values  $\pm$  SE of [ $^{14}\text{C}$ ]tetraethylammonium accumulation were  $17.8 \pm 2.7\%$  and  $39.7 \pm 9.6\%$  for high  $\text{K}^+$  and  $\text{Ba}^{2+}$  media, respectively ( $p < 0.01$  vs. control).

#### Inhibition of hOCT2-Mediated Transport of [ $^{14}\text{C}$ ]Metformin by Cationic Drugs

To assess the potencies of cationic drugs to cause drug-interactions with hOCT2-mediated metformin transport, we examined the inhibitory effects of several cationic compounds on the uptake of [ $^{14}\text{C}$ ]metformin by the hOCT2-expressing cells (Fig. 4). Then, we calculated the  $\text{IC}_{50}$  values of cationic compounds from the inhibition plots as described in "Materials and Methods." Tetraethylammonium (a typical substrate for the renal organic cation transporter), 1-methyl-4-phenylpyridinium (a cationic neurotoxin), procainamide and quinidine (antiarrhythmic drugs), trimethoprim (an antibiotic), and cimetidine and ranitidine ( $\text{H}_2$  receptor antagonists) inhibited the uptake of [ $^{14}\text{C}$ ]metformin by hOCT2-expressing cells in a dose-dependent manner. As summarized in Table I, 1-methyl-4-phenylpyridinium showed the most potent inhibi-

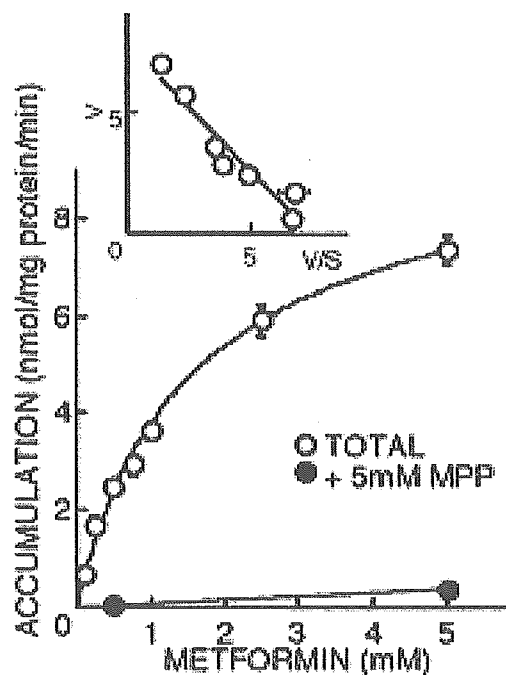


Fig. 2. Concentration dependence of [ $^{14}\text{C}$ ]metformin transport by hOCT2. hOCT2 transfectants were incubated at 37°C for 2 min with various concentrations of [ $^{14}\text{C}$ ]metformin (100, 250, 500, 750, 1000, 2500, and 5000  $\mu\text{M}$ ) in the absence (○) or presence (●) of 5 mM 1-methyl-4-phenylpyridinium (pH 7.4). Each point represents the mean  $\pm$  SE of three monolayers from a typical experiment. Inset: Eadie-Hofstee plots of metformin uptake after correction for non-saturable components. V, uptake rate ( $\text{nmol mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ); S, metformin concentration (mM).

tory effect, whereas procainamide and cimetidine had moderate inhibitory effects on the transport of metformin by hOCT2. Furthermore, biguanides inhibited the transport of [ $^{14}\text{C}$ ]metformin by hOCT2 in the following order: phenformin > buformin > metformin.

#### DISCUSSION

In the current study, we characterized [ $^{14}\text{C}$ ]metformin transport using hOCT2-expressing HEK293 cells, and assessed drug interactions between metformin and cationic drugs using [ $^{14}\text{C}$ ]metformin as a tracer. [ $^{14}\text{C}$ ]metformin uptake was markedly enhanced in HEK293 cells stably transfected with hOCT2 (Fig. 1). The uptake of [ $^{14}\text{C}$ ]metformin was dependent on membrane potential (Fig. 3), being consistent with the functional characteristics of OCT2 (13,19). To our knowledge, this is the first demonstration showing direct evidence of metformin transport by hOCT2. Considering that hOCT2 is the dominant organic cation transporter expressed in the basolateral membranes of the human renal cortex (10), hOCT2 should play a relevant role in the transport of metformin across basolateral membranes in the human kidney.

The accumulation of [ $^{14}\text{C}$ ]metformin in hOCT2-expressing cells was saturated at high concentrations (Fig. 2). Although the driving force of both compounds by hOCT2 seems to be common, that is, the membrane potential (Fig. 3), the apparent affinity of metformin to hOCT2 ( $K_m = 1.38$  mM) was much lower than that of tetraethylammonium

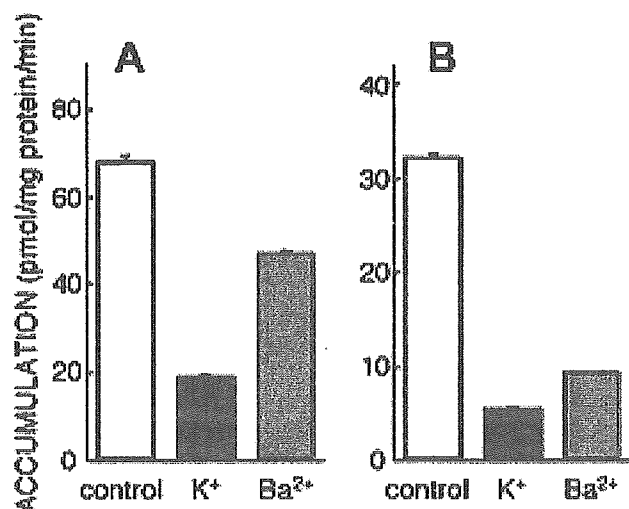


Fig. 3. Effect of membrane potential on [ $^{14}\text{C}$ ]metformin (A) and [ $^{14}\text{C}$ ]tetraethylammonium (B) transport by hOCT2. The cells transfected with hOCT2 were incubated with respective buffers at  $37^\circ\text{C}$  for 2 min with  $10\ \mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]metformin (A) or  $5\ \mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]tetraethylammonium (B) (pH 7.4). Each column represents the mean  $\pm$  SE of three monolayers from a typical experiment.

( $K_m = 431\ \mu\text{M}$ ) (13). Because the maximum plasma concentration of metformin was reported to be 9–12  $\mu\text{M}$  after a single oral administration of metformin HCl (850 mg) in patients with type 2 diabetes mellitus (20–22) and up to 15  $\mu\text{M}$  and 25  $\mu\text{M}$  in healthy elderly patients and patients with moderate chronic renal impairment, respectively (23), the transport of metformin by hOCT2 should not saturate at therapeutic concentrations. Moreover, these results seem to be

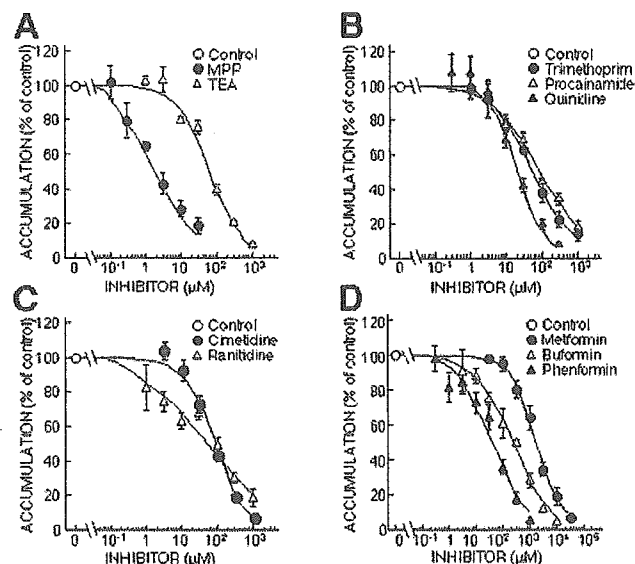


Fig. 4. Effects of cationic compounds on [ $^{14}\text{C}$ ]metformin transport by hOCT2. HEK 293 cells transfected with hOCT2 were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 2 min with  $10\ \mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]metformin (pH 7.4) in the presence of (A) 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP, ●) or tetraethylammonium (TEA, Δ); (B) trimethoprim (●), procainamide (Δ), or quinidine (▲); (C) cimetidine (●) or ranitidine (Δ); (D) metformin (●), bufornin (Δ), or phenformin (▲). Each point represents the mean  $\pm$  SE of three to six separate experiments using three monolayers.

Table I. The Apparent  $\text{IC}_{50}$  Values of Various Cationic Compounds for [ $^{14}\text{C}$ ]Metformin Uptake by hOCT2

Compounds	Apparent $\text{IC}_{50}$ values for [ $^{14}\text{C}$ ]metformin uptake ( $\mu\text{M}$ )
MPP	$2.99 \pm 1.15$
Quinidine	$17.4 \pm 5.7$
Phenformin	$55.3 \pm 12.5$
Trimethoprim	$60.0 \pm 19.0$
TEA	$66.6 \pm 2.3$
Cimetidine	$72.6 \pm 11.4$
Ranitidine	$74.6 \pm 32.2$
Procainamide	$79.8 \pm 7.5$
Bufornin	$203 \pm 63$
Metformin	$1840 \pm 370$

See experimental conditions in the legend of Fig. 4. The apparent  $\text{IC}_{50}$  values were calculated from inhibition plots (Fig. 4) by nonlinear regression analysis as described in "Materials and Methods." The data represent the mean  $\pm$  SE of three to six separate experiments using three monolayers. MPP, 1-methyl-4-phenylpyridinium; TEA, tetraethylammonium.

comparable with the reports by Sambol *et al.* (20) that renal clearance of metformin was not changed by single dosings between 850 mg and 2550 mg, respectively.

In the current study, we demonstrated the inhibition of hOCT2-mediated [ $^{14}\text{C}$ ]metformin transport by various cationic drugs, and then calculated respective  $\text{IC}_{50}$  values (Fig. 4 and Table I). Of the organic cations tested, quinidine or procainamide inhibited [ $^{14}\text{C}$ ]metformin transport with  $\text{IC}_{50}$  values of 17.4  $\mu\text{M}$  and 79.8  $\mu\text{M}$ , respectively, which were comparable to the plasma concentrations of these drugs. It is reported that the plasma concentration of *N*-acetylprocainamide, a major metabolite of procainamide, also inhibit renal organic cation transporters (24). Moreover, the plasma procainamide concentration was elevated, when the drug was administered concomitantly with cimetidine (25). Therefore, we consider that concomitant administration of quinidine or procainamide with metformin should decrease the tubular secretion of metformin by interrupting hOCT2.

Somogyi *et al.* (7) reported the presence of drug interactions between metformin and cimetidine, where renal clearance of metformin was reduced by cimetidine, while cimetidine disposition was not altered by concomitantly administered metformin. According to the fact that apparent  $K_m$  value of metformin transport by hOCT2 was about 10-fold larger than that of cimetidine ( $K_m = 145\ \mu\text{M}$ , unpublished observation), it seems to be reasonable that renal disposition of metformin, but not of cimetidine, was decreased by the drug interaction between these drugs. Dresser *et al.* (16) reported that  $\text{IC}_{50}$  value of metformin on hOCT2-mediated [ $^3\text{H}$ ]cimetidine transport was 1700  $\mu\text{M}$ . Because the value was approximately 100-fold higher than the therapeutic concentration of metformin, we consider that their results may indicate the unchanged disposition of cimetidine by concomitant administration of metformin, which was observed by Somogyi *et al.* (7).

The transport of [ $^{14}\text{C}$ ]metformin was inhibited dose-dependently by cimetidine. This phenomenon apparently seems to be comparable to the observation by Somogyi *et al.* (7) that cimetidine inhibited the tubular secretion of metformin, and thereby increased its plasma concentration. The  $\text{IC}_{50}$  value of cimetidine for metformin transport ( $72.6 \pm 11.4\ \mu\text{M}$ )

was moderately higher than the plasma concentration of cimetidine, i.e., a single oral dose of 200 mg of cimetidine to the patients with normal renal function gave  $C_{\max}$  values of between 2.3  $\mu\text{M}$  and 6.8  $\mu\text{M}$  (26). These data suggest that contribution of hOCT2 in the drug interaction between metformin and cimetidine would be minimum. However, it is known that systemic clearance of cimetidine decreases in the patients with renal dysfunction (27) and in the elderly (28), and thereby increases plasma concentrations of cimetidine. Therefore, the role of hOCT2 in the drug interactions between metformin and cimetidine could be relatively large in the patients with decreased renal function.

In the current study, the order of the potencies of biguanides to inhibit [ $^{14}\text{C}$ ]metformin transport was phenformin > buformin > metformin. Dresser *et al.* (16) also demonstrated that the potency of phenformin to inhibit [ $^3\text{H}$ ]cimetidine transport by hOCT2 was higher than that of metformin, suggesting consistency with the data in the present study. Interestingly, Wang *et al.* (14,15) also reported the order of affinity of biguanides to the rOCT1 was phenformin > buformin > metformin, suggesting similar substrate spectrum between OCT1 and OCT2. This phenomenon seems to be reasonable, because substrate spectrums were similar between OCT1 and OCT2 as demonstrated by us (11,12). Because the information regarding the relationship between plasma concentration of biguanides and blood lactose levels is limited (21), the role of hOCT2 in the biguanides-induced lactic acidosis should be clarified in subsequent studies.

In conclusion, hOCT2 is involved in the basolateral membrane transport of metformin in the human kidney. hOCT2 could also play a relevant role in the drug interaction between metformin and some cationic drugs.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by a grant-in-aid for Comprehensive Research on Aging and Health from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, by a grant-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Culture and Sports of Japan, and by the 21st Century COE program "Knowledge Information Infrastructure for Genome Science."

#### REFERENCES

1. P. Marchetti, R. Giannarelli, A. di Carlo, and R. Navalesi. Pharmacokinetic optimisation of oral hypoglycaemic therapy. *Clin. Pharmacokinet.* **21**:308–317 (1991).
2. T. B. Klepser and M. W. Kelly. Metformin hydrochloride: An antihyperglycemic agent. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **54**:893–903 (1997).
3. I. W. Campbell. Metformin and the sulphonylureas: The comparative risk. *Horm. Metab. Res. Suppl.* **15**:105–111 (1985).
4. C. R. Sirtori, G. Franceschini, M. Galli-Kienle, G. Cighetti, G. Galli, A. Bondioli, and F. Conti. Disposition of metformin (N,N-dimethylbiguanide) in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* **24**:683–693 (1978).
5. P. J. Pentikäinen, P. J. Neuvonen, and A. Penttilä. Pharmacokinetics of metformin after intravenous and oral administration to man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **16**:195–202 (1979).
6. A. Somogyi and M. Muirhead. Pharmacokinetic interactions of cimetidine 1987. *Clin. Pharmacokinet.* **12**:321–366 (1987).
7. A. Somogyi, C. Stockley, J. Keal, P. Rolan, and F. Bochner. Reduction of metformin renal tubular secretion by cimetidine in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **23**:545–551 (1987).
8. V. Gorboulev, J. C. Ulzheimer, A. Akhoundova, I. Ulzheimer-Teuber, U. Karbach, S. Quester, C. Baumann, F. Lang, A. E. Busch, and H. Koepsell. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol.* **16**:871–881 (1997).
9. L. Zhang, M. J. Dresser, A. T. Gray, S. C. Yost, S. Terashita, and K. M. Giacomini. Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Mol. Pharmacol.* **51**:913–921 (1997).
10. H. Motohashi, Y. Sakurai, H. Saito, S. Masuda, Y. Urakami, M. Goto, A. Fukatsu, O. Ogawa, and K. Inui. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**:866–874 (2002).
11. Y. Urakami, M. Okuda, S. Masuda, H. Saito, and K. Inui. Functional characteristics and membrane localization of rat multispecific organic cation transporters, OCT1 and OCT2, mediating tubular secretion of cationic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **287**:800–805 (1998).
12. Y. Urakami, M. Okuda, S. Masuda, M. Akazawa, H. Saito, and K. Inui. Distinct characteristics of organic cation transporters, OCT1 and OCT2, in the basolateral membrane of renal tubules. *Pharm. Res.* **18**:1528–1534 (2001).
13. Y. Urakami, M. Akazawa, H. Saito, M. Okuda, and K. Inui. cDNA cloning, functional characterization, and tissue distribution of an alternatively spliced variant of organic cation transporter hOCT2 predominantly expressed in the human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**:1703–1710 (2002).
14. D. S. Wang, J. W. Jonker, Y. Kato, H. Kusuhara, A. H. Schinkel, and Y. Sugiyama. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**:510–515 (2002).
15. D. S. Wang, H. Kusuhara, Y. Kato, J. W. Jonker, A. H. Schinkel, and Y. Sugiyama. Involvement of organic cation transporter 1 in the lactic acidosis caused by metformin. *Mol. Pharmacol.* **63**:844–848 (2003).
16. M. J. Dresser, G. Xiao, M. K. Leabman, A. T. Gray, and K. M. Giacomini. Interactions of n-tetraalkylammonium compounds and biguanides with a human renal organic cation transporter (hOCT2). *Pharm. Res.* **19**:1244–1247 (2002).
17. Y. Urakami, N. Kimura, M. Okuda, and K. Inui. Creatinine transport by basolateral organic cation transporter hOCT2 in the human kidney. *Pharm. Res.* **21**:976–981 (2004).
18. M. M. Bradford. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254 (1976).
19. M. Okuda, H. Saito, Y. Urakami, M. Takano, and K. Inui. cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**:500–507 (1996).
20. N. C. Sambol, J. Chiang, M. O'Conner, C. Y. Liu, E. T. Lin, A. M. Goodman, L. Z. Benet, and J. H. Karam. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of metformin in healthy subjects and patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Pharmacol.* **36**:1012–1021 (1996).
21. A. J. Scheen. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin. Pharmacokinet.* **30**:359–371 (1996).
22. M. B. Davidson and A. L. Peters. An overview of metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Med.* **102**:99–110 (1997).
23. N. C. Sambol, J. Chiang, E. T. Lin, A. M. Goodman, C. Y. Liu, L. Z. Benet, and M. G. Cogan. Kidney function and age are both predictors of pharmacokinetics of metformin. *J. Clin. Pharmacol.* **35**:1094–1102 (1995).
24. T. Katsura, M. Takano, Y. Tomita, M. Yasuhara, K. Inui, and R. Hori. Characteristics of organic cation transporter in rat renal basolateral membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1146**:197–202 (1993).
25. A. Somogyi, A. McLean, and B. Heinzow. Cimetidine-procainamide pharmacokinetic interaction in man: Evidence of competition for tubular secretion of basic drugs. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **25**:339–345 (1983).
26. R. Larsson, G. Bodemar, and B. Norlander. Oral absorption of cimetidine and its clearance in patients with renal failure. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **15**:153–157 (1979).
27. P. A. Bjaeldager, J. B. Jensen, N. E. Larsen, and E. F. Hvidberg. Elimination of oral cimetidine in chronic renal failure and during haemodialysis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **9**:585–592 (1980).
28. A. Somogyi, H. G. Rohner, and R. Gugler. Pharmacokinetics and bioavailability of cimetidine in gastric and duodenal ulcer patients. *Clin. Pharmacokinet.* **5**:84–94 (1980).



## Restored expression and activity of organic ion transporters rOAT1, rOAT3 and rOCT2 after hyperuricemia in the rat kidney

Yasushi Habu<sup>a</sup>, Ikuko Yano<sup>a</sup>, Masahiro Okuda<sup>a</sup>, Atsushi Fukatsu<sup>b</sup>, Ken-ichi Inui<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacy, Kyoto University Hospital, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

<sup>b</sup> Division of Artificial Kidneys, Kyoto University Hospital, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

Received 22 October 2004; accepted 13 December 2004

### Abstract

We previously reported that in hyperuricemic rats, renal impairment occurred and organic ion transport activity decreased, accompanied with a specific decrease in the expression of rat organic anion transporters, rOAT1 and rOAT3, and organic cation transporter, rOCT2. In the present study, we investigated the reversibility of the organic ion transport activity and expression of organic ion transporters (slc22a) during recovery from hyperuricemia. Hyperuricemia was induced by the administration of a chow containing uric acid and oxonic acid, an inhibitor of uric acid metabolism. Four days after discontinuance of the chow, the plasma uric acid concentration returned to the normal level, and renal functions such as creatinine clearance and BUN levels were restored, although the recovery of tubulointerstitial injury was varied in sites of the kidney. Basolateral uptake of *p*-aminohippurate (PAH) and tetraethylammonium (TEA), and both protein and mRNA levels of rOAT1, rOAT3 and rOCT2 in the kidney gradually improved during 14 days of recovery from hyperuricemia. Basolateral PAH transport showed a higher correlation with the protein level of rOAT1 ( $r^2 = 0.80$ ) than rOAT3 ( $r^2 = 0.34$ ), whereas basolateral TEA transport showed a strong correlation with rOCT2 protein ( $r^2 = 0.91$ ). The plasma testosterone concentration, which is a dominant factor in the regulation of rOCT2, was gradually restored during the recovery from hyperuricemia, but the correlation between the plasma testosterone level and rOCT2 protein expression in the kidney was not significant. These results suggest that the regulation of organic ion transporters, rOAT1, rOAT3 and rOCT2, by hyperuricemia is reversible, and the organic ion transport activity restores according to the expression levels of these transporters.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Renal transport; Organic anion transporter; Organic cation transporter; slc22a; Rats; Hyperuricemia

### 1. Introduction

Urinary excretion of various compounds including endogenous metabolites, drugs and xenobiotics is an important physiological function of the renal proximal tubules. In renal tubules, membrane transport systems mediate the tubular secretion, and several isoforms of organic anion and cation transporters have been characterized [1,2]. Two organic anion transporters, OAT1 and OAT3, at the renal basolateral membrane mediated the renal tubular secretion of several anionic drugs including *p*-aminohippurate (PAH), nonsteroidal anti-inflammatory drugs, methotrexate and cephalosporins [3–8]. On the other hand, organic cation transporters, OCT1 and OCT2, were localized to basolateral membranes of renal

tubular cells, and contributed to the transport of many cationic compounds including tetraethylammonium (TEA), cimetidine, monoamines and procainamide [8–12].

We previously reported that renal organic anion and cation transport activity across the basolateral membrane was decreased in hyperuricemic rats, accompanied with decreased expression of some organic ion transporters, rOAT1, rOAT3 and rOCT2 [13]. In contrast, the renal expression levels of rOCT1, OAT-K1 and OAT-K2, kidney-specific organic anion transporters, and organic anion transporting polypeptide 1 (oatp1) were unchanged in hyperuricemic rat kidney [13]. Renal clearances of methotrexate and cimetidine were also decreased in hyperuricemic rats, suggesting that the down-regulation of rOAT1, rOAT3 and rOCT2 partly accounts for the decreased renal disposition of these drugs [13].

Altered expression of renal organic ion transporters has been reported using several animal models with renal impairment induced by cisplatin and by subtotal nephrect-

Abbreviations: PAH, *p*-aminohippurate; TEA, tetraethylammonium

\* Corresponding author. Tel.: +81 75 751 3577; fax: +81 75 751 4207.

E-mail address: [inui@kuhp.kyoto-u.ac.jp](mailto:inui@kuhp.kyoto-u.ac.jp) (K.-i. Inui).