

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第1分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

## 第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用—非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立—	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

## 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性・安全性に関する研究



- 炎症性サイトカインの影響. 第14回 Airway Club in Sendai 研究会、仙台、9月、2005.
- 2) 堂前真理子、相良博典、福田健、上川雄一郎：炎症性サイトカインによるロイコトリエンC4合成酵素の発現調節の検討. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡、10月、2005.
  - 3) 磯幸博、澤田登起彦、北順二、下田貢、六角丘、加藤正人、根本猛彦、窪田敬一：分子マーカーによる肝細胞癌再発の Predicting value について. 第105回日本外科学会総会. 名古屋. 5月、2005.
  - 4) 磯幸博、澤田登起彦、岡田としえ、北順二、六角丘、加藤正人、根本猛彦、下田貢、窪田敬一：Ecard、OPNのmRNAによるHCV-HCC術後早期再発の予測に関する検討. 第64回日本癌学会. 札幌、9月、2005.
  - 5) Nakai, K., Ozawa, S., Suzuki, F., Kumada, H., Tanaka, H., Hanada, K., Sunouchi, M., Kubota, K., Kamikawa, Y., Ogata, H. and Ohno, Y.: Levels of messenger RNA encoding drug metabolism enzymes and drug transporters in the liver of chronic hepatitis C patients. ISSX/JSSX meeting (Maui, Hawaii) (2005.10.22-27)
  - 6) Miyajima-Tabata, A., Ozawa, S., Tanaka, H., Nakai, K., Sunouchi, M., Sawada, J., Kamikawa, Y., Kubota, K., Ogata, H. and Ohno, Y.: The Crosstalk of nuclear receptors on the expression of CYP isoforms in Japanese liver tissue. ISSX/JSSX meeting (Maui, USA) (2005.10.22-27)
  - 7) Kurebayashi, H. and Ohno, Y.: In vitro metabolism of ametryne and prometryne by human liver microsomes and human cytochrome P450 isoforms. ISSX/JSSX meeting (Maui, USA) (2005.10.22-27)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 知的所有権の取得状況  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価

所 属 東京大学大学院薬学系研究科  
研究者 澤 田 康 文

研究要旨：胎盤灌流実験により薬物の胎盤透過を評価し、それに基づく薬物の胎児毒性予測法を構築した。また、胎盤に発現する各種有機アニオン輸送担体の発現確認や機能解析をすすめ、胎盤試料を用いた輸送特性解析との対応をとることができるようになった。(114/120)

### 分担研究者

- (1) 東京大学大学院薬学系研究科 大谷壽一、堀里子
- (2) 九州大学大学院薬学研究院 辻本雅之
- (3) 九州大学大学院医学研究院 月森清巳

### A. 研究目的

薬物の有害反応の中でも、胎児毒性は最も注意しなければならない毒性の一つであり、妊婦への薬物投与は特に慎重に行われなければならない。一方、さまざまな疾患の治療のために、妊娠中にもかかわらず薬物の投与を受けなければならない妊婦も少なからず存在する。しかしながら、現在臨床上使用されている薬物のほとんどは、妊婦に投与した場合、胎児に対する安全性が保証されていない。また近年では、薬物以外の環境汚染化学物質や環境ホルモンなどによる胎児毒性も深刻な問題となっている。

母体に投与された薬物などの生体異物は胎盤を介して胎児へと移行するが、胎盤には血液胎盤関門が存在し、ここでの物質移行は厳密にコントロールされている。したがって、薬物の胎児毒性を評価する上では、その胎盤透過性、胎児移行性を評価することが必要不可欠である。このため多くの医薬品については、開発段階において、マウスなどの動物を用いて胎児移行性の評価が行われている。しかし、ヒトとマウスの胎盤は構造的に全く異なっており、また、血液胎盤関門では動物種ごとに機能特性を異になる薬物輸送担体が発現しているため、薬物の胎児移行性を評価するためにはヒト胎盤を用いた多面的なアプローチが不可欠といえる。

そこで本年度の研究においては、まず、モデル薬物としてアニオン性の非ステロイド性消炎鎮痛薬であるジクロフェナクを取りあげ、さまざまなプロトコルのヒト胎盤灌流法を用いてその胎児移行性を評価した。得られた実験結果に、昨年度構築した薬物動態モデルを適用して解析するとともに、昨年までのサリチル酸ならびにアンチピリンの灌流実験・解析の成果と比較することを目的とした。また、薬物の灌流液中の蛋白結合率を測定することで、それを考慮した考察を展開することとした。さらに、ジクロフェナクの胎盤透過に、プロトン依存性の乳酸を基質とする薬物輸送担体が関与している可能性を、胎盤灌流法により確認することも目指した。また現在までに、胎盤組織においてサリチル酸やジクロフェナクの輸送を担う輸送担体は同定されていないが、乳酸などのモノカルボン酸を輸送する輸送系（モノカルボン酸トランスポータファミリー；MCTs）の関与が示唆されていたため、胎盤灌流実験との連携を視野に、RT-PCR 法及び PCR 産物の直接塩基配列決定により、胎盤組織及び BeWo 細胞における各種 MCTs アイソフォームの発現を確認することとした。

研究の臨床的意義の評価においては、ジクロフェナク及びサリチル酸に関して昨年度並びに本年度に得られた胎盤灌流実験の結果に対してモデル解析を適用して算出した薬物動態パラメータをもとに、ジクロフェナク及びサリチル酸を母体に常用量投与した際の胎児血中濃度推移を予測し、それらの胎児移行に伴う胎児の副作用の強度を、モデルシミュレーションにより予測することを試み

た。

一方、胎盤においては organic anion transporters (OATs) として OAT4, organic anion transporting polypeptides (OATPs) として OATP-B, OATP-D, 及び OATP-E が発現していることを昨年度において確認した。しかし、これらの輸送担体の胎盤における寄与を定量的に評価するためには、まず個々の輸送担体の特性、すなわち駆動力、輸送親和性、基質特異性、阻害剤による阻害プロファイルなどを評価し、それらと、胎盤組織由来の標本（例えばトロホプラスト由来微絨毛膜標本など）における輸送とを比較することが必要となる。また、胎盤組織における検討において、阻害剤を用いる際にも、各輸送担体に対する特異性をあらかじめ評価する必要がある。そこで、本研究班においてはこれまでに OAT4 及び OATP-B の安定発現系細胞を樹立し、研究に供してきたが、本年度は、OATP-D 及び OATP-E に関しても、同様に安定発現細胞を樹立することを目的とした。

昨年より検討を継続した OAT4 の機能については、トロホプラスト細胞を介したアニオン性化合物の移行における OAT4 の寄与を解明することを目的とし、OAT4 の基質認識性を明らかにするため、OAT4 と様々な構造を有する化合物との間の相互作用について検討した。また、胎盤におけるアニオン性薬物の胎児から母体方向への排出輸送における OATPs の役割を明らかにするために、胎盤基底膜小胞における胆汁酸の輸送特性の検討についても着手した。

## B. 研究方法

*In vitro* ヒト胎盤灌流ではまず、胎盤から直径 4-6 cm のコチレドンを選択し、胎児側血管にカテーテルを挿入・結紮した後、灌流液で脱血を行った。次にコチレドンを切り取り、灌流装置にセットした後、胎児側を灌流した。母体側は、絨毛間腔に三叉の針を刺入し、灌流した。最初の 30 分間は薬物を含まない灌流液を胎児側、母体側に灌流し、安定化を行った。灌流実験のプロトコルは、母体から胎児への輸送をみる灌流実験（母体側薬物灌流実験）、胎児から母体側への輸送をみる灌流実験（胎児側薬物灌流実験）、及び washout 灌流実験の三種について行った。薬物としてはジ

クロフェナク (100 ng/mL) を、単純拡散マーカであるアンチピリン (50  $\mu$ g/mL) とともに灌流した。また、乳酸輸送系の阻害剤として非標識 L-乳酸を含む灌流液を用いた。すなわち、Krebs-Ringer-bicarbonate buffer の NaCl の一部を 35 mM L-lactic acid で置換したものに、D-glucose (1.0 g/L), heparin (12,500 IU/L), dextran (1.0 g/L) 及び human serum albumin (2.0 g/L) を添加し、pH 及び浸透圧を調整して用いた。アンチピリン、サリチル酸及びジクロフェナクの灌流液中蛋白質に対する結合率は、平衡透析法により、既報の方法に従って検討した。アンチピリン、サリチル酸及びジクロフェナク濃度の定量は、いずれも HPLC-UV 法で行った。

胎盤組織等における MCTs アイソフォームの発現検討は、RT-PCR 法により行った。Total RNA は、RNeasy Mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を用いてヒト胎盤組織及び BeWo 細胞から抽出し、これを鋳型に逆転写を行い、cDNA を得た。PCR 用のプライマーセットは、各 MCT アイソフォームの cDNA 配列をもとに設計した。PCR 反応は、逆転写反応物を鋳型に行った。PCR 産物をアガロースゲルより切り出して精製し、塩基配列決定を行った。

胎盤灌流実験のデータ解析にあたっては、アンチピリンについては dead volume compartment, intervillous compartment 及び placental compartment の 3 つのコンパートメントを考慮したキネティックモデルを、ジクロフェナクについては、dead volume compartment, intervillous compartment, placental compartment 及び fetal venous compartment の 4 つのコンパートメントを考慮したキネティックモデルを構築した。各種プロトコルにおける個々の灌流実験における母体側灌流液中濃度、胎児側灌流液中濃度及び胎盤組織中薬物量の経時変化に、各コンパートメントにおけるマスバランス式をあてはめ、キネティックパラメータを算出した。パラメータのうち、母体血及び胎児血から胎盤組織への influx clearance (それぞれ  $K_1$  及び  $K_2$ ) を、実験的に求めた灌流液中の蛋白非結合型分率  $f_b$  で除することにより、それぞれの非結合型クリアランス ( $K'_1$  及び  $K'_2$ ) を算出した。さらに、 $K'_1$  にはヒト母体血漿中における蛋白非結合型分率 ( $f_{p,m}$ ) の既報文献値 (ジクロフェナク: 0.007, サリ

チル酸: 0.568) を乗じ、 $K'_4$ にはヒト胎児血漿中における蛋白非結合型分率 ( $f_{p,i}$ )の既報文献値 (ジクロフェナク: 0.006, サリチル酸: 0.457) を乗じることにより、ヒト *in vivo* における血漿クリアランス ( $K'_1$  及び  $K'_4$ ) を推算した。続いて、健常人女性におけるジクロフェナク及びサリチル酸の薬物動態パラメータを既報の文献から算出した。続いて、胎児を一つのコンパートメントとみなした薬物動態モデルに基づき、母体にジクロフェナクまたはサリチル酸をそれぞれ常用量経口連続投与時の定常状態における胎児血漿中濃度をシミュレーションした。シミュレーションにあたっては、胎児による代謝はなく、体重あたりの分布容積は胎児と成人とで同等と仮定した ( $V = V_d \times 3/60$ , 母体体重, 60 kg; 胎児体重, 3 kg)。

OATP-D 及び OATP-E の安定発現細胞は、human embryonic kidney cell line (HEK-293 細胞) を親細胞として、哺乳動物発現用ベクター pIRESneo を用いて遺伝子導入を行った。すなわち、OATP-D cDNA は翻訳領域を 5' 側及び 3' 側に分け、ヒト腎臓 total RNA から逆転写反応により得られた first-strand cDNA を鋳型に PCR を行うことで単離した。得られた PCR 産物を TA クローニング法により pCR2.1 ベクターにサブクローニングした。続いて、OATP-D 翻訳領域中の制限酵素認識部位を利用し、3' 側コンストラクトから制限酵素を用いて切り出した断片を、同様に制限酵素処理した 5' 側コンストラクトへ組み込んだ。得られた OATP-D 翻訳領域の全長を、pIRESneo へ組み込んだ。OATP-E cDNA はヒト腎臓 cDNA を鋳型に PCR により単離した。得られた PCR 産物を制限酵素処理し、同様に処理した pIRESneo ベクターへ組み込んだ。作成した pIRES/OATP-D 及び pIRES/OATP-E コンストラクトについて、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit を用いてシーケンス反応を行い、塩基配列を解析した。

一過性発現系における取り込みは、pIRES/OATP-E コンストラクトを Lipofect AMINE 2000 Reagent (Invitrogen) を用いて約 1  $\mu$ g のプラスミドをトランスフェクトし、24 時間培養後取り込み実験を行った。安定発現系の構築においては、pIRESneo に OATP-D および OATP-E の遺伝子を組み込んだ pIRES/OATP-

D および pIRES/OATP-E をヒト胎児腎由来 HEK293 細胞にリポフェクション法を用いて導入した。トランスフェクション後、ディッシュに希釈継代し、さらに 24 時間後、G418 メディウムに交換し、安定発現細胞のセレクションを行った。

OAT4 の機能解析に関しては、HEK-OAT4 細胞への [ $^3$ H]estrone-3-sulfate (E3S) の取り込みに対する、BCRP の阻害剤である mitoxantrone、MRP1 及び MRP2 の阻害剤である glutathione、MRP2 及び P-gp の阻害剤である cyclosporine A 並びに P-gp の阻害剤である progesterone による阻害効果を検討した。また、OAT4 の基質選択性について検討するため、HEK-OAT4 への E3S 取り込みに対する様々な薬物の阻害効果を検討した。さらに、取り込み阻害効果が観察された valproate 及び pranlukast について、それらの放射標識体を用いて、HEK-OAT4 への取り込みを検討した。

胎盤由来基底膜小胞 (BLMV) への胆汁酸の取り込みにおいては、常法に従い BLMVs を調製し、[ $^3$ H]taurocholate の取り込みを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、九州大学医学研究院等倫理委員会及び東京大学大学院薬学系研究科の倫理委員会より承認を受けた上で遂行した。研究にあたっては上記委員会による承認された研究計画を遵守するとともに、胎盤の提供については、上記委員会により承認された書式の提供同意書を用いて文書による同意を得た上で研究に供した。

なお、本研究においては、胎盤試料は連結不可能匿名化としており、胎盤提供者の個人情報 は削除された形で研究に供されている。

## C. 研究結果

ジクロフェナクの胎盤灌流実験を行ったところ、母体側薬液灌流実験においては、実験開始後、比較的速やかに胎児側灌流液中に検出され、母体側及び胎児側の両灌流液中濃度は灌流開始後約 15 分ではほぼ定常状態に達した。ジクロフェナクの TPTss 値は 2.22% であり、アンチピリンやサリチル酸と比較して小さかった。胎児側薬液灌流実験開始後は、ジクロフェナクの胎児側灌流液中濃度は速やかに一定となり、母体側へのアンチピリンの透過はわずかであった。コンパートメントモ

デル解析の結果、モデルは実測値を良好に表現することができた。また、灌流液中におけるジクロフェナク、サリチル酸及びアンチピリンの蛋白非結合率 ( $f_b$ ) を測定した結果、それぞれ 4.4%、90.2% 及び 93.2% であった。灌流液中のアルブミン濃度はヒト血漿よりはるかに低いにも関わらず、特にジクロフェナクは高い蛋白結合率を示した。乳酸の影響に関する検討においては、乳酸非存在下における単純拡散マーカーであるアンチピリンの TPTss 値は 6.94% であり、灌流液中に 35 mM L-乳酸が存在する条件下でも 6.16% とほとんど変化しなかった。これに対して、ジクロフェナクの TPTss 値は、L-乳酸非存在下では 2.22% であったのに対して、35 mM L-乳酸存在下では 1.54% と有意に低下していた。MCTs アイソフォームの発現確認においては、BeWo 細胞においては MCT1, 3, 5, 6, 及び 7 の発現が、また胎盤組織においては検討したすべてのアイソフォーム、すなわち MCT 1~7 の発現が、いずれも mRNA レベルで確認された。

母体が、サリチル酸またはジクロフェナクを常用量（それぞれ 1 回 50 mg 1 日 2 回または 1 回 300 mg 1 日 3 回）服用した際の定常状態における母体及び胎児血漿中薬物濃度推移を予測した。その結果、サリチル酸の胎児最高血漿中濃度は母体最高血漿中濃度の約 1/2、ジクロフェナクの胎児最高血漿中濃度は母体最高血漿中濃度の約 1/10 と予測された。また、シクロオキシゲナーゼ (COX) 2 の阻害に関する  $IC_{50}$  値の文献値を胎児最高血漿中濃度で除することにより算出した両薬物の安全係数は、サリチル酸では 2.92、ジクロフェナクでは 0.704 であり、ジクロフェナクの方が動脈収縮などの副作用を引き起こす危険性が高いと予測された。

OATP-D 及び OATP-E の安定発現系の構築に関しては、HEK-OATP-D 細胞及び HEK-OATP-E 細胞については、G418 によるセレクションまでが完了し、それぞれ 6 クローン及び 5 クローンを得ることができた。

HEK-OAT4 の機能解析に関しては、HEK-OAT4 細胞への  $[^3H]$ estrone-3-sulfate (E3S) の取り込みは、probenecid により強く阻害され、mitoxantrone 及び glutathione により弱く阻害された。しかし、cyclosporin A 及び progesterone によっては阻害されなかった。ま

た、DHEAS により強く阻害されたが、benzylpenicillin,  $\alpha$ -ketoglutarate, p-aminohippurate, valproate, tetracycline 及び taurocholate による阻害は弱かった。Pranlukast, montelukast, zafirlukast, losartan, cholate, ketorofen は HEK-OAT4 への E3S の取り込みを有意に阻害した。さらに、losartan による強い阻害作用が認められたことから、angiotensin II receptor 拮抗薬である candesartan, candesartan cilexetil, losartan, losartan carboxyl 及び valsartan の阻害効果について検討したところ、いずれも濃度依存的に E3S の取り込みを阻害した。取り込み阻害効果が観察された valproate 及び pranlukast について、それらの放射標識体を用いて、HEK-OAT4 への取り込みを検討した結果、valproate については OAT4 を介した輸送は観察されなかったのに対して、pranlukast は OAT4 の基質となることが示された。

胎盤基底膜小胞における胆汁酸の輸送特性の検討の結果、 $[^3H]$ taurocholate の BLMVs への取り込みは、 $Na^+$  存在下と非存在下とほぼ同程度であり、 $Na^+$  非依存的であった。 $Na^+$  非存在下における  $[^3H]$ taurocholate の取り込みは、1 mM 非標識体存在により減少したことより、飽和性の輸送系の存在が示された。

#### D. 考察

胎盤灌流実験の結果、妊娠満期における胎児毒性が問題となっている薬物として、昨年度のサリチル酸に続いて、ジクロフェナクに関する検討を行うとともに、蛋白結合率の補正を行った。その結果、灌流液中の蛋白非結合型分率 ( $f_b$ ) により補正したジクロフェナクの非結合型としての胎盤組織-母体血漿分配比 (=非結合型としての分布容積)、すなわち  $K_1/f_b/k_2$  は 15.4 mL/g cotyledon と、salicylic acid の  $K_1/f_b/k_2$  (1.89 mL/g cotyledon) より約 10 倍大きかった。また、ジクロフェナクの胎盤組織-胎児血漿分配比、すなわち  $K_4/f_b/k_3$  は 23.3 mL/g cotyledon と、サリチル酸の  $K_4/f_b/k_3$  (0.512 mL/g cotyledon) より約 45 倍大きかった。これらはの結果は、ジクロフェナクの脂溶性 ( $\log P = 0.912/\text{pH } 7.4$ ) が、( $\log P = -2.18/\text{pH } 7.4$ ) と比べて高いことと

良好に対応している。

また今回は、各薬物の非結合型としての母体側及び胎児側からの取込クリアランス ( $K_1/f_b$  及び  $K_2/f_b$ ) を算出することができた。今後は、これらの絶対値と、他の実験系、例えば単離膜小胞などを用いた実験系における取込クリアランスの絶対値と比較検討することにより、膜小胞を用いた実験と胎盤灌流実験のデータをつなぐことが出来ると考えられる。

ジクロフェナクの母体側からの非結合型取込クリアランス ( $K_1/f_b$ ) の値は、サリチル酸やアンチピリンと比較してほぼ 100 倍以上と顕著に大きかった。この差は、ジクロフェナクの脂溶性のみでは説明できない可能性もある。すなわち、ジクロフェナクの母体血から胎盤組織への取り込みには何らかの輸送担体が寄与している可能性が考えられた。また我々は、胎盤絨毛癌由来培養細胞である BeWo 細胞において、ジクロフェナクがプロトン依存的な乳酸の取り込みを阻害することを報告しており、ジクロフェナクが乳酸を輸送する輸送担体と相互作用してその基質となる可能性がある。そこで、灌流液中に乳酸を添加した実験を行った結果、ジクロフェナクの胎盤透過は 35 mM の L-乳酸により有意に抑制された。すなわち、ジクロフェナクの胎児移行は、乳酸によって阻害される何らかの輸送系を介していると考えられた。事実、ヒト胎盤組織において、MCT1-7 すべての MCT アイソフォームの発現が発現していることが今回 mRNA レベルで確認されたことから、今回観測されたジクロフェナクの高い経胎盤透過性と、その乳酸による阻害には、MCT のいずれか又は複数のアイソフォームが寄与している可能性が高いと考えられた。

NSAIDs の胎児毒性は、シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害によるプロスタグランジン生合成阻害に基づくものであることはほぼ間違いない。そして、各種 NSAIDs の COX 阻害強度については、既にヒト *in vitro* において多数の報告がなされている。にも関わらず NSAIDs の胎児毒性の比較検討が行われていなかったのは、これらの薬物のヒトにおける胎児移行性が評価できなかったためと考えられる。今回、サリチル酸とジクロフェナクについて胎児血中濃度を予測し、その値と COX 阻害強度の既報値とを比較することにより、サリチル酸と比較してジクロフェナクの方が胎児毒性

が強い可能性が示唆された。薬物の胎児移行特性に関するキネティックパラメータは、薬物の胎児毒性を評価する上で極めて重要な要素であろう。

昨年度に引き続く OAT4 の機能解析により、OAT4 の機能がさらに詳細に明らかになった。胎盤組織には、BCRP, MRP1, MRP2 及び P-gp などが発現しており、これらのうち、BCRP 及び MRP1 は、E3S を輸送することが示されている。したがって、E3S は OAT4 の代表的な基質ではあるが、シンシチオトロホプラスト細胞を介した E3S の輸送を評価するには、上述のような OAT4 以外の輸送担体の寄与を考慮に入れなければならない。本研究により、OAT4 の機能は、BCRP の基質である mitoxantrone 及び MRP1 及び MRP2 の阻害剤である glutathione によって阻害され、MRP2 及び P-gp の阻害剤である cyclosporin A 並びに P-gp の阻害剤である progesterone によって阻害されないことが明らかになった。また、candesartan, candesartan cilexetil, losartan, losartan carboxyl, valsartan, montelukast, pranlukast 及び zafirlukast による OAT4 の阻害効果も明らかになった。しかし、これら薬物の  $K_i$  値は、ヒトにこれらの薬物を臨床用量投与後に得られる血漿中非結合型濃度と比較して高かったことから、これらの薬物が臨床的に胎盤に存在する OAT4 の機能を阻害する可能性は低いと考えられた。また興味深いことに、candesartan cilexetil, losartan, 及び pranlukast は、アニオン性の置換基として、テトラゾール基を持つ一方でカルボキシル基を有していないにもかかわらず OAT4 を阻害した。このことは、OAT4 がアニオンとしてカルボキシル基だけでなく、テトラゾール基も認識できることを示唆している。そして事実、pranlukast は、HEK-OAT4 へ有意に取り込まれたことから、OAT4 の基質になりうる薬物の構造の一つとして、テトラゾール基を有する薬物があげられると推定された。

胎盤基底膜側におけるアニオン性薬物の輸送については、胎盤においては、肝臓と小腸で見られるような  $\text{Na}^+$  依存的なトランスポーターは存在せず、 $\text{Na}^+$  非依存的なトランスポーターのみを介して胆汁酸が輸送されていると考えられた。この輸送担体の実態としては、OATP family の関与が考えられる。昨年度の我々の検討から、OATP family のうち胎盤における発現が確認されているのは、OATP-B, OATP-D, OATP-E であるが、このうちどのトランスポーターが寄与しているかを特定するためには、さらに詳細な輸送特性の解

明が必要である。今後は、BLMVs における taurocholate 輸送の親和性や阻害剤に対する感受性を検討するとともに、OATP-B, OATP-D, OATP-E の発現系における taurocholate 輸送の特性と比較する必要があるだろう。

#### E. 結論

昨年度確立したヒト胎盤灌流法を用いて、妊娠満期における胎児毒性が問題とされているサリチル酸とジクロフェナクの胎盤透過特性を定量的に評価することができた。さらに、灌流液中の薬物の蛋白結合率を測定することで、胎盤透過における母体血又は胎児血から胎盤組織への非結合型のインフラックスクリアランスを算出することが出来た。また、ジクロフェナクの胎児移行は、乳酸によって阻害される何らかの輸送系を介している可能性を示すことが出来た。胎盤灌流実験により得られたキネティックパラメータをもとにして、臨床上問題となる薬物の胎児毒性を評価することができると考えられた。これらの結果は、胎盤灌流実験法とそのモデル解析の有用性をあらためて示す結果であると考えられる。また、胎盤灌流実験における乳酸の影響に関する結果に対応して、ヒト胎盤組織において MCT 1~7 の発現が確認された。ヒト胎盤におけるモノカルボン酸系薬物の透過には、MCTs が重要な役割を果たしているのだろう。

一方、胎盤に発現している OAT4 は、mitoxantrone, glutathione, cyclosporin A 及び progesterone によりほとんど阻害されないことが示された。今後、これらの阻害剤を用いて輸送実験を行うことにより、OAT4 を介した輸送に影響を与えることなく、BCRP, MRP1, 2, 及び P-gp の寄与を除外して、シンシチオトロホプラスト細胞を介したアニオン性物質の輸送を評価することができると考えられる。また、テトラゾール基を有する化合物が OAT4 の特異的な基質または阻害剤となりうる可能性が考えられた。一方、トロホプラスト細胞基底膜における胆汁酸の輸送に関する検討に着手し、Na<sup>+</sup> 非依存的な輸送系の存在を確認した。今後は、輸送担体の安定発現系における機能解析との比較において、それらを担う輸送担体の同定と輸送特性の解析を行っていく必要がある。

本研究のように、さまざまな実験系の特徴を活かした検討を行うことにより、胎盤における薬物

の透過性を多方面から理解・評価することが可能と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 新宅恭平、辻本雅之、永田秀昭、佐藤昌司、月森清巳、中野仁雄、堀 里子、大谷壽一、大戸茂弘、澤田康文、ヒト胎盤灌流法を用いたジクロフェナクの胎盤透過性の検討、第 15 回日本医療薬学会年会 (岡山、2005 年 10 月)、講演要旨集、p 284

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）

所属 聖マリアンナ医科大学 薬理学

研究者 小林真一

研究期間 平成16年4月～平成18年3月

**研究要旨** ヒト組織のバンクシステム効率化と研究資源高度化を目的として、分担各施設でヒト組織の採取、保存・提供のシステム効率化を検討した。この成果を横断的にまとめ、ヒト組織公共バンクへの提供体制の効率化と研究資源としての質の向上が行われた。

分担研究者

- (1) 自治医科大学分子病態治療研究センター 小林英司
- (2) 聖マリアンナ医科大学 熊井俊夫
- (3) 広島大学大学院 浅原利正
- (4) 国立精神・神経センター神経研究所 後藤雄一、西野一三

### A. 研究目的

各種薬物の反応性に種差があり、医薬品の開発にヒト組織を利用した研究の必要性が広く認知されている。また肝薬物代謝酵素に人種差が明らかになり、日本人の組織を用いた検討が重要になってきている。欧米では移植不適合の患者の組織が研究利用されている。しかし日本で組織を用いるためには手術などで摘出された組織のうち、病理検査に用いない部分の利用しか方法がない。

本研究は、手術により摘出した日本人の組織の一部を適切にかつ十分量研究者にヒト試料として提供するため保存・管理し、ヒュー

マンサイエンスヒト組織公共バンク(HSRRB)へ提供するためのシステム構築の検討を行い、全国の各医療機関でも構築が可能な組織や細胞の質を確保したヒト組織提供機関としてのモデルシステムについて検討する。

このため臨床試験コーディネーター(CRC)を導入したインフォームドコンセント(IC)のあり方、病理医も含めた組織の採取効率化を検討し、HSRRBへのヒト組織提供を前提としたバンクシステムの構築を目的とした。また神経・筋疾患の筋芽細胞および生検筋標本を研究資源として用い、質の確保をはかるとともに、創薬の有効性・安全性についての研究を推進させることを目的としている。

さらにヒト組織の研究利用およびHSRRBの意義について広く認知してもらうためのシンポジウムと意識調査を実施し、今後のバンク事業の方向性について検討した。

### B. 研究方法

(倫理面への配慮)



---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社