

Table 2. Summary of UGT1A4 polymorphisms detected in four studies

SNP ID	Position	From the Location translational initiation site or from the end of exon 1 (IVS1+)	Nucleotide change and flanking sequences (5' to 3')	Amino acid change	Japanese (This study)				Frequency (n=256)	Japanese ^d Frequency (n=100)	Americans ^e Frequency (n=78)	Germans ^f Frequency (n=159)
					Wild-type	Hetero- zygote	Homo- zygote	Number of subjects				
rs3732219	5'-flanking	-219	GGTCAGATGAGC/TTTTCAAGATAG		195	54	7	0.133				
	5'-flanking	-217	GTCAGATGAGCT/GTTCAAGATAGGC		255	1	0	0.002				
rs3732218	5'-flanking	-163	TAACGAAAGGCA/GATTATAGATTAAT		195	54	7	0.133				
	5'-flanking	-36	CAGGCACAGCGT/GAGGGTGGACAGTC		255	1	0	0.002				
	Exon 1	30	GGTCCCCTGCCG/ACGGCTGGCCACA	P10P	254	2	0	0.004				
rs3892221	Exon 1	31	GTTCCCCTGCCG/TGGCTGGCCACAG	R11W	250	6	0	0.012				
rs6755571	Exon 1	70	CTCAGTGCAGC/ACCTGGGCTGAGA	P24T	256	0	0	0.000	0.000	0.077	0.075	
	Exon 1	127	AGCCCCTGGCTC/ACATGCGGGAGG	43fsX22	255	1	0	0.002				
rs2011425	Exon 1	142	ATGGGGAGGCT/GTGGGGAGCTCC	L48V	197	52	7	0.129	0.165	0.026	0.095	
	Exon 1	175	GGCCACCAGGGG/LTGGTCTCACCC	59fsX6	255	1	0	0.002				
	Exon 1	271	AAGGAATTTGATC/TGCGTTACGCTGG	R91C	255	1	0	0.002				
	Exon 1	325	CATCTTGAAGA/GGATAITCTAGAA	R109G	255	1	0	0.002				
	Exon 1	357	AATTATGAACA/TGCGTATCTTTGGCC	N119N	254	2	0	0.004				
rs12468274	Exon 1	448	TTTGATGTGGTT/CTAACAGACCCCG	L150L	195	54	7	0.133	0.155			
rs2011404	Exon 1	471	CGTTAACCTCTGC/TcGGGGCGGTGCTG	C157C	251	5	0	0.010				
rs3732217	Exon 1	804	CTACCCACAGGCG/AAATCAIGCCCAAC	P268P	195	54	7	0.133	0.165			
	Intron 1	IVS1+1	CCACTATCTCAGG/TTCGTATTGGTG		255	1	0	0.002				
rs2011219	Intron 1	IVS1+43	TTCCAGGCAAAAAC/TACTTTTAAAAA		195	54	7	0.133	0.155			
	Intron 1	IVS1+98	ACTTATCTTCCA/GAAGATTTTATT		255	1	0	0.002				
	Intron 1	IVS1+101	TATCTTCCAAAAG/TATTTATTITGG		253	3	0	0.006				

^a Novel variations detected in this study.

^b The SNPs included in the PharmGKB database was shown as "O".

^c T in the reference sequence.

^d Mori A, et al., Drug Metab Disp. 2005;33:672-675.

^e Patiens at H. Lee Moffitt Cancer Center in Tampa, Florida, Wiener D, et al., Cancer Research, 2004;64:1190-1196.

^f Ehmer U., et al., Hepatology 2004;39:970-977.

Table 3. *UGT1A4* haplotypes in a Japanese population

Haplotypes ^a	Nucleotide change ^a		-219	-163	-36	30	31	127	142	175	271	325	357	448	471	804	IVS1 +43 C>T	IVS1 +98 A>G	IVS1 +101 G>T	Frequency	
	Amino acid change		C>T	G>A	G>A	G>A	R11W	43fsX22	L48V	59fsX6	R91C	R109G	N119N	L150L	C157C	P268P					
*1	*1a																			0.818	
	*1b																				0.010
	*1c																				0.008
	*1d																				0.006
	*1e																				0.004
	*1f																				0.004
	*1g																				0.002
	*1h																				0.002
*3	*3a																			0.002	
	*3b																			0.002	
*4	*4a																			0.123	
*5	*5a																			0.002	
*6	*6a																			0.012	
*7	*7a																			0.002	
*8	*8a																			0.002	

^aA of the translational start codon of *UGT1A4* is numbered 1. AF297093.1 was used as the reference sequence.

^bThe haplotypes were described as a number plus a small alphabetical letter.

Table 4. Glucuronidation activities of P24T and L48V towards various substrates

Substrate	Category	Ehmer ^b Expressed in HEK293 cells		Wiener ^d Human liver microsome		Mori ^f Expressed in COS-7 cells	
		UGT1A4 Wild type	UGT1A4 P24T	UGT1A4 L48V	24P/24P	24T/24T	UGT1A4 Wild type
β -Naphthylamin	Carcinogenic	31.8	9.7	18.2			
Benzidine	aromatic amine	1.9	n.d. ^c	1.3			
trans-Androsterone		86	54	1.5		0.42	4.35
Dihydrotestosterone	Androgene	27	18	n.d. ^c			
NNAL ^a	nicotine-derived nitrosamine				10.0 \pm 5.7	13.9 \pm 5.2 ^e	
Clozapine						25.4 \pm 4.8	52.7 \pm 13.1 ^g
Imipramine	Antipsycotic					0.61	1.07
Cyproheptadine	Antihistamine					1.51	2.35
Tigogenin	Plant steroid					20.33	9.16

^a 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone

^b Ehmer U., et al., Hepatology 2004;39:970-977.

^c not detected

^d Wiener D, et al., Cancer Research, 2004;64:1190-1196.

^e significantly different from the result of 24P/24P

^f Mori A, et al., Drug Metab Disp. 2005;33:672-675.

^g significantly different from the result obtained by UGT1A4 wild type

分担研究報告書

ヒト肝組織における SLCO1B1 及び CYP3A mRNA 発現量の人種差
分担研究者 千葉 寛 千葉大学大学院教授

研究要旨

平成17年度は、日本人と白色人種及びヒスパニック（メキシコ系アメリカ人）の肝組織を用い、SLCO1B1 及び CYP3A mRNA 発現量をこれらの人種間で比較した。その結果、今回検討を行った3人種間においては、SLCO1B1 mRNA 発現量に大きな個人差が存在するものの、人種間には大きな差異は認められないことが明らかとなった。個人差の原因として-11187G>A の SLCO1B1 mRNA 発現量に対する影響を比較したが、白人種日本人いずれにおいても SNP 保有者 (heterozygote) と非保有者 (wild type の homozygote) 間では、SLCO1B1 mRNA 発現量への有意な差は認められなかった。一方、CYP3A4 mRNA については、検討を行った3人種間で平均値に大きな差が認められ、白人種>日本人>ヒスパニックの順で発現量の平均値が大きかった。これらの人種差には発現量の低い検体の割合が反映されている傾向が認められたことから、今後これらの検体がどのような要因によって発現量の低下が引き起こされているかを明らかにする必要があるものと考えられた。

A. 研究目的

ヒト肝細胞に発現する薬物取り込みトランスポーターである Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1/OATP-C, *gene symbol SLCO1B1*) は、肝臓に特異的に発現し、他の OATP ファミリーと比較し肝臓における発現量が高いことが報告されている。また OATP1B1 は、胆汁酸などの生体内物質に加えて HMG-CoA 還元酵素阻害薬など多くの薬物の肝臓への取り込みに関与していることから、様々な化合物の肝選択的移行を制御する重要なトランスポーターである。

薬物トランスポーターに個人差を生じる原因には、その機能や発現量における個人差が考えられる。これまでに OATP1B1 には機能低下を伴う一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) が複数報告されている。なかでも、膜貫通領域内にアミノ酸置換を伴う SNP のひとつである 521T>C は、OATP1B1 の細胞膜上における

発現量を減少させ、OATP1B1 による基質輸送量を低下させるとの報告がある。このように OATP1B1 の遺伝子多型による輸送活性の個人差は、その基質となる様々な化合物の体内動態に大きな影響を与えるものと考えられる。

一方、CYP3A は、多くの医薬品の代謝に重要な役割を果たす CYP subfamily であり、CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43 の4分子種からなる。これらの分子種の中で医薬品の代謝に最も重要なのは CYP3A4 であり、CYP で代謝を受ける薬物の 50%以上に関わっているとされている。CYP3A4 の肝臓における発現量に 10-50 倍のばらつきがあり、クリアランスでも 11-48 倍のばらつきがある。この原因の一つとして遺伝子多型の存在が示唆されているが、これまでに、報告されている CYP3A4 遺伝子に関する変異発現頻度の多くは白人種について解析されたものであり、日本人や黒人種に関する情報は少ない。

本研究では、白人、日本人およびヒスパ

ニックにおける *SLCO1B1* 及び *CYP3A4* の個人差と人種差を、これらの人種の肝組織における mRNA 発現量を比較することにより検討し、得られた結果を遺伝子多型との関係から考察した。

B. 研究方法

1 肝組織

白人種肝検体 (Caucasian liver, CL, n = 25) およびヒスパニック肝検体 (Hispanic liver, HL, n = 5) は、Human and Animal Bridging 協議会から御恵与賜った。上記検体は、National Disease Research Interchange を介して得た移植不適合のヒト肝組織および肝細胞である。日本人種肝検体 (Japanese liver, JL, n = 31) およびヒスパニック肝検体 (HL, n = 1) は、国立国際医療センターおよび国立がんセンター東病院から御恵与賜った。上記検体は、これらの施設において手術を受けた患者の切除肝組織の正常部位である。本研究におけるこれら検体の研究利用は、千葉大学薬学研究院倫理審査委員会において事前に承認されている。

2 ヒト肝組織からの total RNA の抽出および first strand cDNA の合成

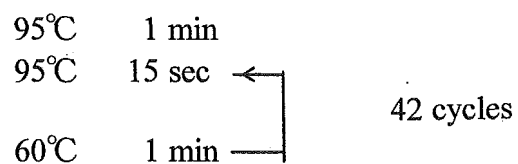
ヒト肝組織からの total RNA の抽出は、SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) を用いてプロトコール通りにおこなった。約 30 mg の肝組織切片より得られた total RNA は、Ultrospec 4000 UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて 260 nm および 280 nm の吸光度を測定することにより定量した。Total RNA の純度は、ホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動により 28S ribosomal RNA (rRNA) と 18S rRNA の比をとることにより確認した。またゲノム DNA 混入の有無は、AmpliTaQ Gold (Applied Biosystems, CA, USA) と table 1 に示した primer (human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH) forward and reverse) (Proligo, Boulder, CO, USA) を用いた PCR によりおこない、ゲノム DNA の混入が認められたものについては DNase I (TaKaRa Bio, Shiga, Japan) 処理によりゲノム DNA を除去した。

First strand cDNA の合成は Ready-to-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech) を用いてプロトコール通りにおこなった。Total RNA 2 µg、random hexamer (Amersham Pharmacia Biotech) 2.5 µL を混合した溶液を用いて、次に示す PCR 条件により逆転写反応をおこなった：42°C 30 min、95°C 5 min。

3 Real time PCR 法

PCR および DNA 増幅の検出は、ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystems) を用いておこなった。反応液は、テンプレートとして cDNA 1 µL、2× Real time PCR Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) 12.5 µL、TaqMan probe および primer を含む *SLCO1B1* 及び *CYP3A4* 遺伝子の TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) 1.25 µL、さらに内部標準遺伝子の probe と primer を含む TaqMan® PreDevelopped Assay Reagents (Applied Biosystems) 1.25 µL を混合し、滅菌 MilliQ で全量を 25 µL とした。この反応液を用いて、以下に示す条件で PCR をおこなった。



mRNA 発現量の補正方法は、Vandesompele ら (2002) や Jacques ら (2005) の報告を参考として、*SLCO1B1* 遺伝子の発現量を 4 種の内部標準遺伝子 (human GAPDH、human cyclophilin (Cyc)、human β-glucuronidase (GUS) および human acidic ribosomal protein (PO)) の測定値の平均値で割ることにより補正した。

4 ヒト肝組織からのゲノム DNA 抽出法

ヒト肝組織からのゲノム DNA 抽出は、ヒト肝組織約 30 mg から ChargeSwitch® gDNA Micro Tissue Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) を用いてプロトコール通りにおこなった。DNA の定量および純度の測定は、Ultraspec 4000 UV/Visible Spectrophotomete (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて 260 nm および 280 nm の吸光度を測定することによりおこなった。

5 Genotyping 法

SNP の genotyping はダイレクトシーケンシング法によりおこなった。目的の SNP を含む領域はヒト肝ゲノム DNA を template とし、primer を用いた PCR 法により増幅した。反応液は、template DNA 2 μ L、10 \times PCR Buffer for KOD -Plus- 5 μ L、dNTP mixture 5 μ L、10 μ M primer 1.6 μ L、KOD -Plus- DNA Polymerase (TOYOBO) 1.0 μ L を混合し、滅菌 MilliQ で全量を 50 μ L とした。PCR 反応は以下に示す方法によりおこなった。

94°C	2 min	} 40 cycles
94°C	15 sec	
54°C	20 sec	
68°C	35 sec	
68°C	3 min	

得られた PCR 産物は、2.5% アガロースゲルを用いて電気泳動し、Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) により精製した。

6 統計解析

統計解析は以下の方法を用いておこなった。白人、日本人、およびヒスパニックの3つの人種間における mRNA 発現量の比較は、one-factor ANOVA (analysis of variance between groups) を用いておこなった ($P < 0.025$)。白人、日本人およびヒスパニック

各群における SNP の保有者と非保有者間の mRNA 発現量の比較は、Mann-Whitney U test を用いておこなった ($P < 0.05$)。ルシフェラーゼアッセイ法における転写活性化能の差は、Student's t-test によっておこなった ($P < 0.05$)。いずれの解析においても P 値が 0.05 以下の場合において有意差ありとした。上記の統計計算は、Statcel エクセル統計ソフト (オーエムエス, Tokyo, Japan) を用いておこなった。

C. 研究結果

1. 白人、日本人およびヒスパニックの肝における SLCO1B1 mRNA 発現量の個人差

ヒト肝検体における SLCO1B1 mRNA 発現量を測定した結果、ヒト肝 62 検体 (Caucasian, $n = 25$; Japanese, $n = 31$; Hispanic, $n = 6$) の中で CL 4 が最も低い値を示した。以降、この測定値を基準 (=1) として各検体について相対比 (arbitrary units) をとることとした。

白人種肝における SLCO1B1 mRNA 発現量を比較した結果、検体間で約 30 倍の差が認められた (Fig. 1)。このうち著しく発現量の低い検体が 2 検体 (CL 4, CL 23)、発現量の低い傾向を示す検体が 2 検体 (CL 21, CL 28) 存在した。これら 4 検体を除く残りの検体間で比較すると、SLCO1B1 mRNA 発現量に関して約 3 倍の差が認められた。日本人種肝における SLCO1B1 mRNA 発現量を比較した結果、検体間で約 4.5 倍の差が認められた (Fig. 2)。このうち著しく発現量の高い検体が 2 検体 (JL 34, JL 38) 存在した。これら 2 検体を除く残りの検体間で比較すると、SLCO1B1 mRNA 発現量に関して約 3 倍の差が認められた。ヒスパニック肝における SLCO1B1 mRNA 発現量を比較した結果、検体間で約 1.7 倍の差が認められた (Fig. 3)。白人、日本人およびヒスパニックの 3 つの人種間における SLCO1B1 mRNA 発現量を比較した結果、その平均値はそれぞれ 15.44、18.65、18.82 (arbitrary

units) となり、これらの間に有意な差は認められなかった ($P = 0.34$, one-factor ANOVA, Fig. 4)。

2. 白人、日本人およびヒスパニック肝における *SLCO1B1* mRNA 発現量への SNP (-11187G>A) の影響

ヒト肝 62 検体のゲノム DNA を用いて、*SLCO1B1* 遺伝子 5' 上流領域における SNP (-11187G>A) の解析をおこなった結果、SNP (-11187G>A) と wild type (-1187G.>G) の heterozygote は、白人種においては $n = 5$ (約 20%)、日本人種においては $n = 5$ (約 16%)、ヒスパニックにおいては $n = 0$ (約 0%) 認められた。残りの検体に関しては、すべて wild type の homozygote であった。

次に SNP (-11187G>A) の *SLCO1B1* mRNA 発現量に対する影響を比較した結果、白人種および日本人種いずれにおいても SNP 保有者 (heterozygote) と非保有者 (wild type の homozygote) 間では、*SLCO1B1* mRNA 発現量への有意な差は認められなかった ($P = 0.95$, $P = 0.1$, one-factor ANOVA, Fig. 5)。

3. SNP (-11187G>A) の *SLCO1B1* 遺伝子 5' 上流領域に存在するの転写活性への影響

ヒト肝癌由来細胞の HepG2 細胞と FLC4 細胞を宿主細胞として、pGL3-Basic vector に *SLCO1B1* 遺伝子 5' 上流領域を組み込んだコンストラクトを用いた Reporter gene assay 法をおこなった結果、HepG2 細胞および FLC4 細胞いずれにおいても、転写活性化能に wild type と mutant の間には有意な差は認められなかった ($P = 0.12$, $P = 0.18$, Student's t-test, Fig. 6)。

4. 白人、日本人およびヒスパニック肝における CYP3A4 mRNA 発現量の人種差

白人種肝における CYP3A4mRNA 発現量を比較した結果 (Fig. 7)、検体間で約 4600 倍の差が認められた。このうち著しく発現量

の低い検体が 6 検体、発現量の低い傾向を示す検体が 10 検体存在した。これら 16 検体を除く残りの検体間で比較すると、CYP3A4mRNA 発現量に関して約 13 倍の差が認められた。

次に日本人肝における CYP3A4mRNA 発現量を比較した結果、検体間で約 25 倍の差が認められた。このうち発現量の低い傾向を示す検体が 1 検体存在した。この検体を除く残りの検体間で比較すると、CYP3A4mRNA 発現量に関して約 11 倍の差が認められた。次にヒスパニック肝における CYP3A4mRNA 発現量を比較した結果、検体間で約 318 倍の差が認められた。発現量の低い傾向を示す 1 検体を除く残りの検体間で比較すると、CYP3A4mRNA 発現量に関して約 8 倍の差が認められた。従って、いずれの人種においても発現量の低い検体を除いた場合には、約 10 倍の個人差が認められた。

D. 考察

白人種においては、他の多くの検体と比較し著しく *SLCO1B1* mRNA 発現量の低い検体および低い傾向を示す検体が 4 検体存在したことから、これらの検体には *SLCO1B1* mRNA 発現量を減少させる何らかの要因が存在する可能性が示唆された (Fig. 1)。一方日本人種においては、他の検体と比較し *SLCO1B1* mRNA 発現量の高い傾向を示す検体が 2 検体存在したことから、これらの検体には *SLCO1B1* mRNA 発現量を上昇させる何らかの要因が存在する可能性が示唆された (Fig. 2)。また、これらの検体を除いて *SLCO1B1* mRNA 発現量を比較した場合においても、日本人種および白人種いずれにおいても *SLCO1B1* mRNA 発現量に約 3 倍の差が認められたことから、上記とは別の要因が存在する可能性も考えられる。以上より、*SLCO1B1* mRNA の発現にはその発現量を減少させる、または上昇させる複数の因子が存在し、そのために *SLCO1B1* mRNA 発現量に大きな個人差を生じる可能性があることが明らかとなった。そこでさらに *SLCO1B1* mRNA 発現量に影

響を及ぼしうる要因について検討をおこなった。

mRNA の発現量において個人差が生じる原因には、遺伝子多型、加齢、性差など様々な要因が考えられる。まず、遺伝子多型に着目して検討をおこなった。これまでに OATP1B1 において複数の遺伝子多型が存在することが報告されており、近年、*SLCO1B1* 遺伝子 5' 上流領域に SNP -11187G>A が存在することが報告されている。この SNP を含む *SLCO1B1* haplotype のひとつとして*17 が報告されており、この*17の保有者では pravastatin の area under the plasma concentration curve が非保有者に比べ大きく上昇するとの報告がある。Pravastatin の体内動態には OATP1B1 が大きく寄与することが報告されていることから、SNP (-11187G>A) が OATP1B1 の機能や発現量に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

しかしながら、今回の結果は -11187G>A が *SLCO1B1* mRNA 発現量へ与える影響はほとんどないことを示しており (Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7)、この SNP が mRNA 発現量の個人差の原因となっている可能性は少ないものと考えられた。Niemi らの報告(2004)において *in vivo* でみられた pravastatin の体内動態変化については、*17 が SNP (-11187G>A) に加えて OATP1B1 タンパク質の機能低下を伴う SNP (521T>C) も併せ持っているため、後者の SNP が大きな影響を与えているものと考えられた。

一方、CYP3A4mRNA については、白人種において CYP3A4mRNA 発現量の低い検体が全体の半分以上を占めており、平均値を下げる結果となっている。実際、これら3人種間における CYP3A4mRNA 発現量の平均値はそれぞれ 1.8 ± 3.1 , 4.1 ± 2.9 , 7.1 ± 7.7 (normalized values by internal standard) であり、発現量の低い検体の割合が平均値の人種差に反映されているものと考えられた。今後 CYP3A4mRNA 発現量の低い検体はどのような要因を持つ検体であるかについて明らかにすることが人種差の原因解明につながるものと考えられた。

E. 結論

本研究の結果より *SLCO1B1* mRNA 発現量には大きな個人差が存在するが人種間では発現量に大きな差異は存在しないことが示された。また、個人差の原因として -11187G>A の *SLCO1B1* mRNA 発現量に対する影響を比較したが、白人種日本人いずれにおいても SNP 保有者 (heterozygote) と非保有者 (wild type の homozygote) 間では、*SLCO1B1* mRNA 発現量への有意な差は認められなかった。さらに、*SLCO1B1* 遺伝子 5' 上流領域を組み込んだコンストラクトを用いた Reporter gene assay 法をおこなった結果、HepG2 細胞および FLC4 細胞いずれにおいても、転写活性化能に -11187G>A の wild type と mutant の間には有意な差は認められなかったことから、この SNP が *SLCO1B1* mRNA の発現量の個人差に関係している可能性は低いものと考えられた。

一方、CYP3A4mRNA については、検討を行った3人種間で平均値に大きな差が認められ、白人種>日本人>ヒスパニックの順で発現量の平均値が大きかった。これらの人種差には発現量の低い検体の割合が反映されている傾向が認められたことから、今後これらの検体がどのような要因によって発現量の低下が引き起こされているかを明らかにする必要があるものと考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

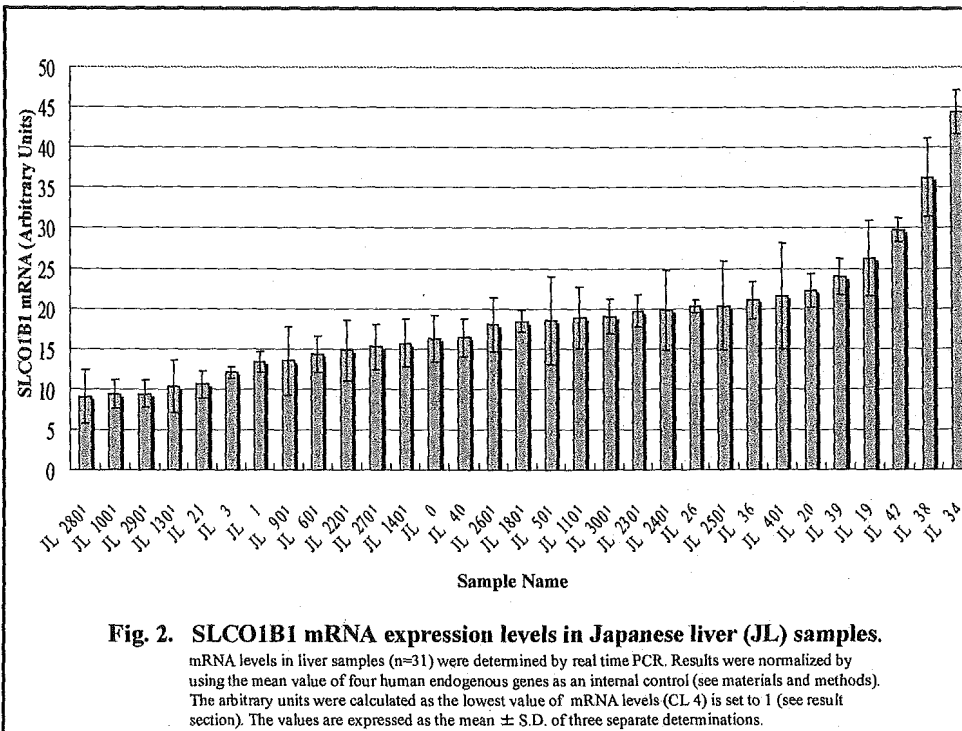
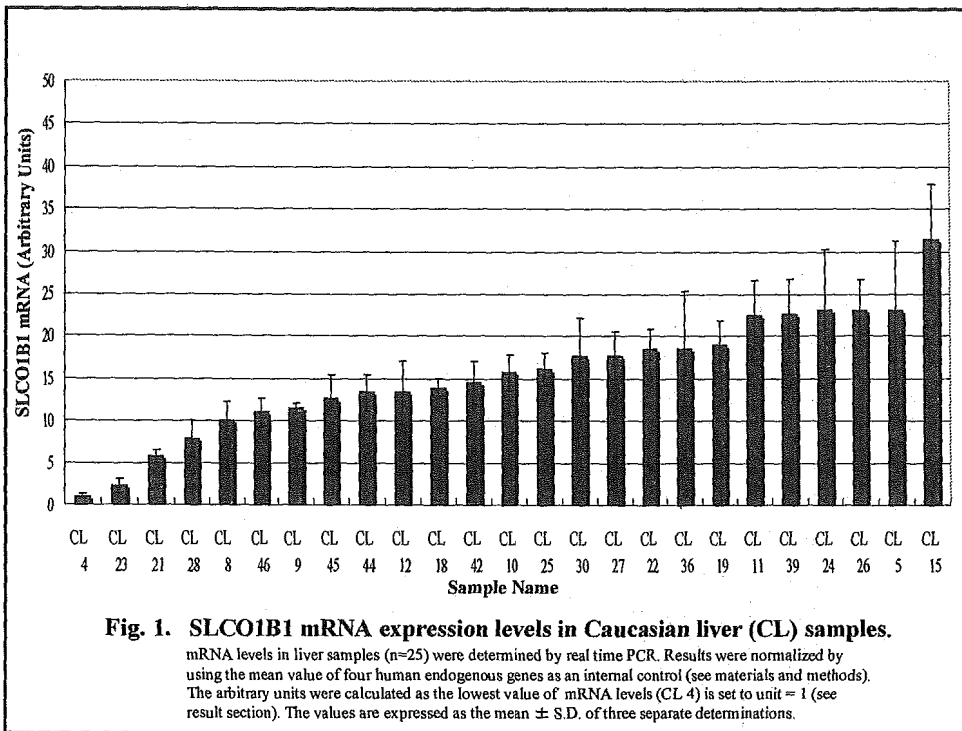
論文発表

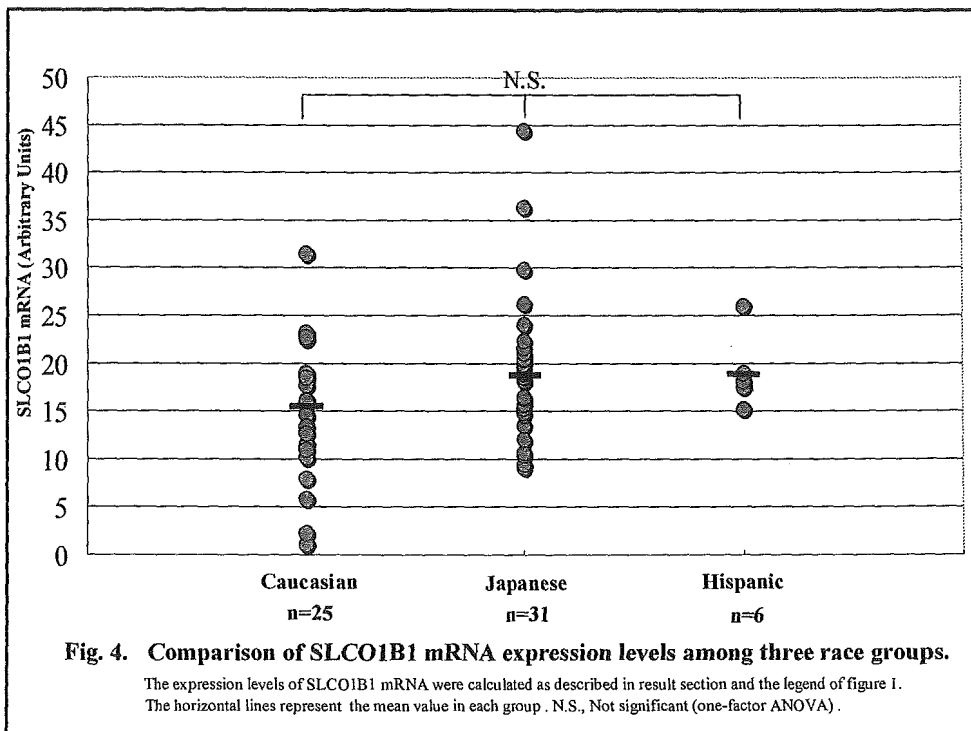
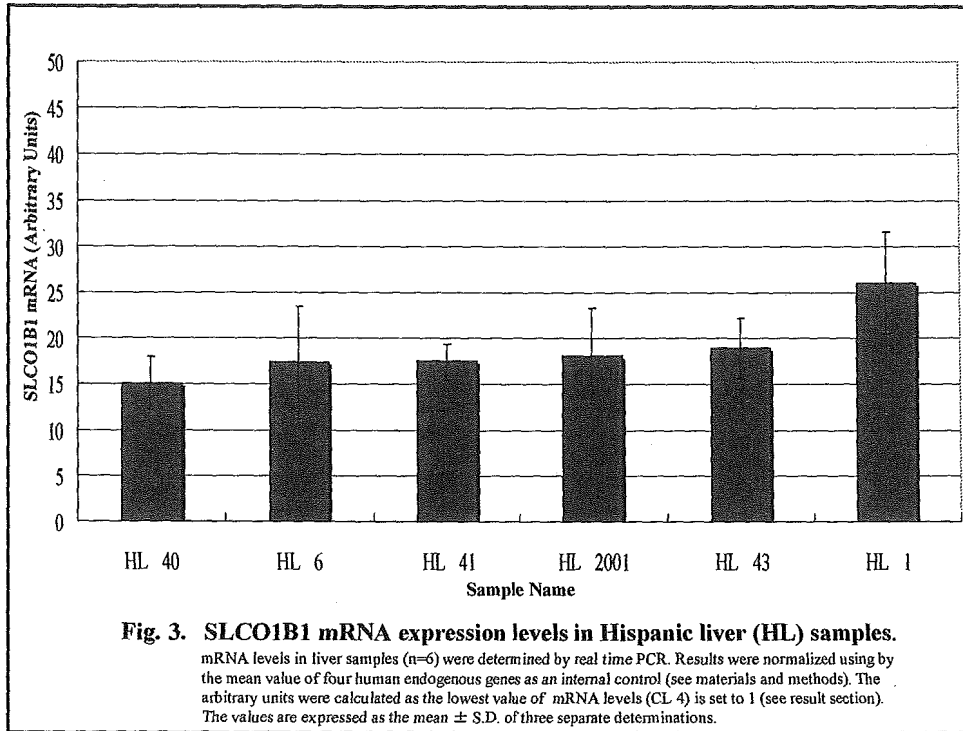
1. Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K: Functional characterization of *SLCO1B1* (OATP-C) variants, *SLCO1B1**5, *SLCO1B1**15 and *SLCO1B1**15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenet Genomics*. 15:513-22, 2005.

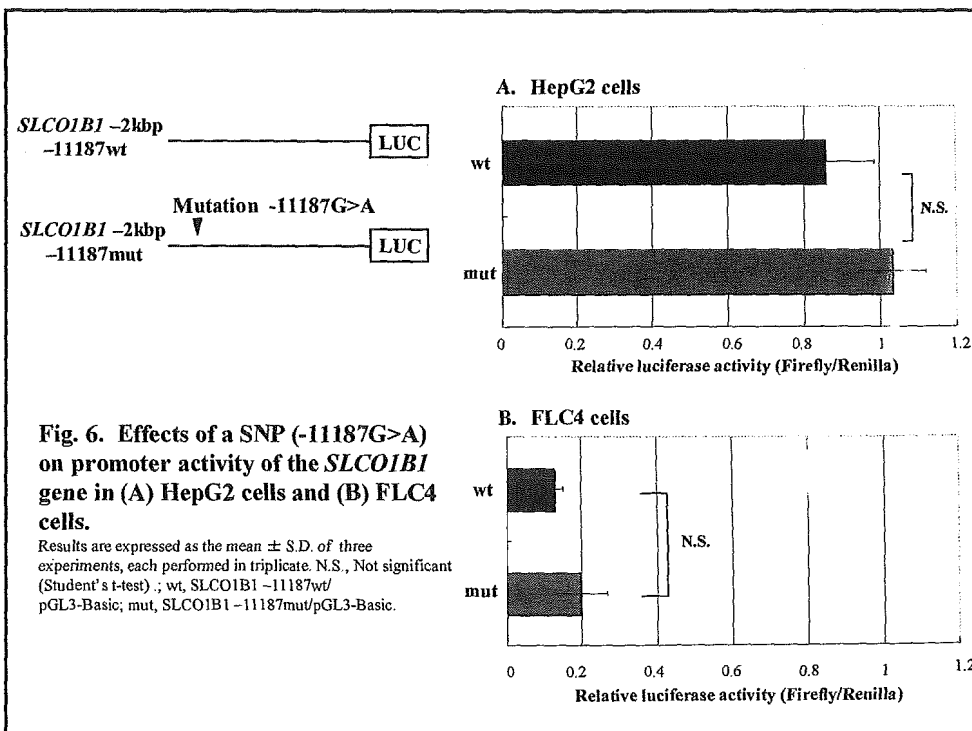
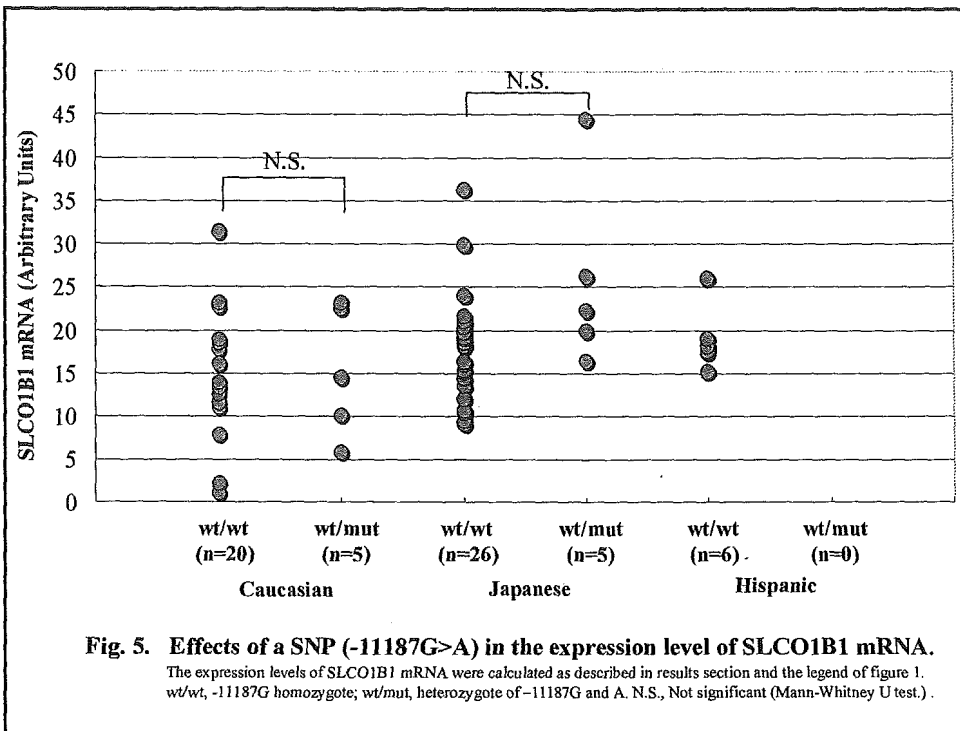
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし







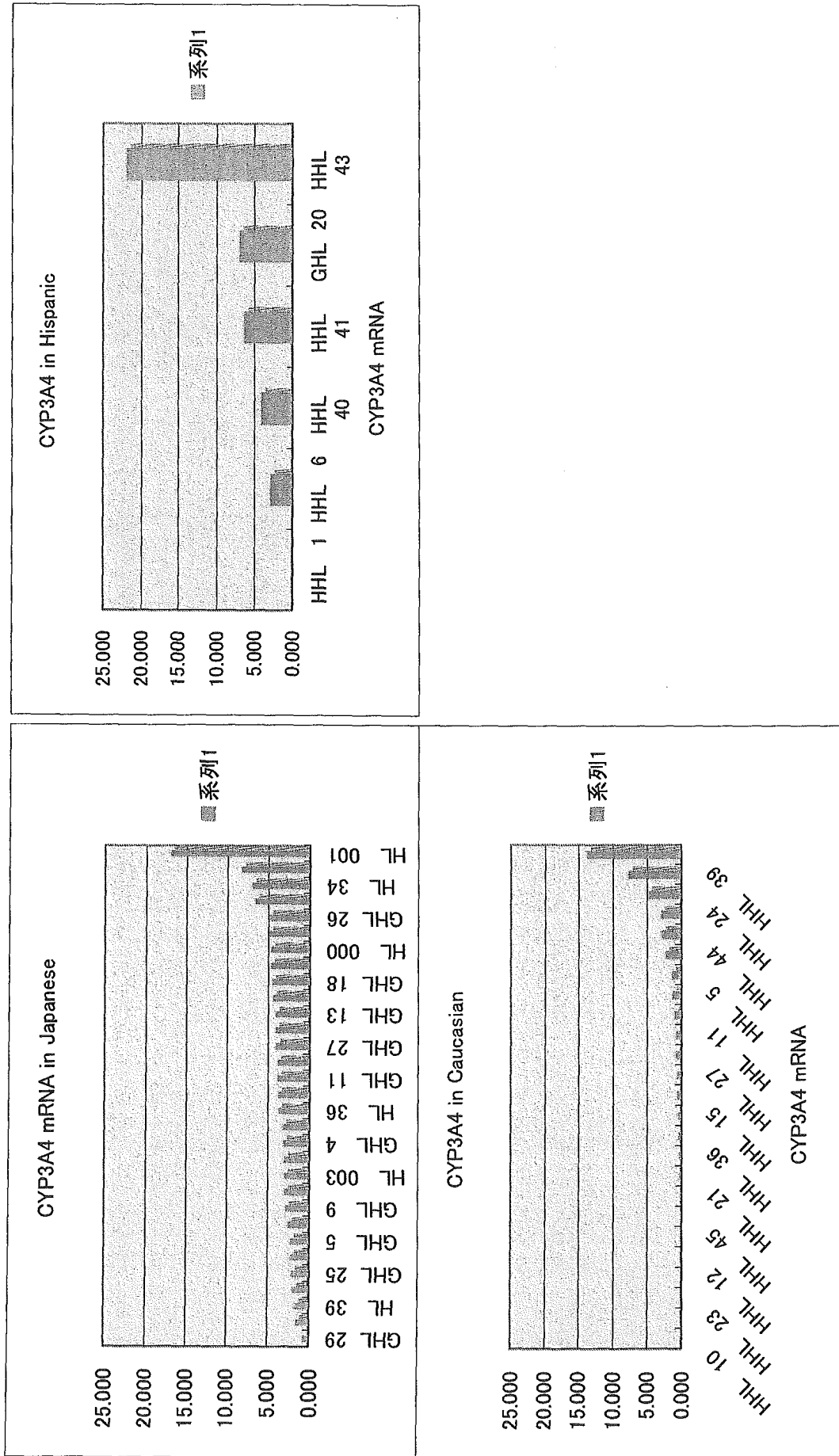


Fig. 7 CYP3A4 mRNA expression levels in Japanese, Hispanic and Caucasian liver samples.

別添6

III 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K	Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, <i>SLCO1B1</i> *5, <i>SLCO1B1</i> *15 and <i>SLCO1B1</i> *15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells.	Pharmacogenetics and Genomics.	15	513-522	2005
M. Saeki, Y. Saito, H. Jinno, K. Sai, A. Hachisuka, N. Kaniwa, S. Ozawa, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Shirao, H. Minami, A. Ohtsu, T. Yoshida, N. Saijo, K. Komamura, T. Kotake, H. Morishita, S. Kamakura, M. Kitakaze, H. Tomoike and J. Sawada:	Genetic variations and haplotypes of UGT1A4 in a Japanese population.	Drug Metabolism and Pharmacokinetics.	20	144-151	2005
<u>Ieiri I, Kimura M, Irie S, Urae A, Otsubo K, Ishizaki T.</u>	Interaction magnitude, pharmacokinetics and pharmacodynamics of ticlopidine in relation to CYP2C19 genotypic status.	Pharmacogenetics and Genomics	15	851-859-	2005

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA, Morita T, Ritchie MD, Scordo MG, Pengo V, Barban M, Padrini R, Ieiri I, Otsubo K, Kashima T, Kimura S, Kijima S, Echizen H	Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans.	Pharmacogenet Genomics	16	101-110	2006
高橋晴美、Wilkinson GR、Nutescu EA、森 田隆司、Scordo MG、 Pengo V、Barban M、Padrini R、家入 一郎、大坪健二、賀嶋 俊隆、木村壮介、木島 慎一、越前宏俊	日本人、白人、黒人患者の ワルファリン投与量の個人 差に及ぼすVKORC1と CYP2C9多型の影響	日本血栓止血学会 誌	16	549	2005
Ogawa R, Kishi R, Mihara K, Takahashi H, Takagi A, Matsumoto N, Masuhara K, Nakazawa K, Miyake F, Kobayashi S, Echizen H.	Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of a class IC antiarrhythmic, pilsicainide, in patients with cardiac arrhythmias	J Clin Pharmacol	46	59-68	2006
Ohnishi A, Murakami S, Akizuki S, Mochizuki J, Echizen H, Takagi I	In vivo metabolic activity of CYP2C19 and CYP3A in relation to CYP2C19 genetic polymorphism in chronic liver disease.	J Clin Pharmacol	45	1221-12 29	2005

別添 7

IV 研究成果の刊行物・別刷

Functional characterization of *SLCO1B1* (OATP-C) variants, *SLCO1B1*5*, *SLCO1B1*15* and *SLCO1B1*15 + C1007G*, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells

Yoshio Kameyama^{a,b}, Keiko Yamashita^a, Kaoru Kobayashi^a, Masakiyo Hosokawa^a and Kan Chiba^a

Objectives *SLCO1B1*5* and *SLCO1B1*15* have been reported to reduce the clearance of pravastatin in healthy volunteers. However, there remains controversy in the effects of *SLCO1B1*5* on the activity of OATP1B1 *in vitro*. In addition, the effect of *SLCO1B1*15* on the function of OATP1B1 has not been studied using cDNA-expression systems. Object of the present study was to study the influence of *SLCO1B1*5*, **15* and **15 + C1007G*, a novel haplotype found in a patient with pravastatin-induced myopathy, on the functional properties of OATP1B1 by transient expression systems of HEK293 and HeLa cells using endogenous conjugates and statins as substrates.

Methods Transporting assays for endogenous substrates were performed using tritium labeled estradiol-17 β -D-glucuronide and estrone-3-sulfate. Quantitation of pravastatin, atorvastatin, cerivastatin and simvastatin were carried out using HPLC tandem mass spectrometry.

Results The transporting activities of cells expressing *SLCO1B1*5*, **15* and **15 + C1007G* decreased significantly but those of *SLCO1B1*1b*, **1a + C1007G* and **1b + C1007G* were not altered for all of the substrates tested except for simvastatin. Kinetic analysis of pravastatin and atorvastatin showed that K_m values were not altered but V_{max} values decreased significantly in cells expressing *SLCO1B1*5*, **15* and **15 + C1007G*. Immunocytochemical study showed that *SLCO1B1*5*,

**15* and **15 + C1007G* proteins are localized not only at the plasma membrane but also in the intracellular space.

Conclusions These findings suggest that 521T>C, existing commonly in *SLCO1B1*5*, **15* and **15 + C1007G*, is the key single nucleotide polymorphism (SNP) that determines the functional properties of *SLCO1B1*5*, **15* and **15 + C1007G* allelic proteins and that decreased activities of these variant proteins are mainly caused by a sorting error produced by this SNP. *Pharmacogenetics and Genomics* 15:513–522 © 2005 Lippincott Williams & Wilkins.

Pharmacogenetics and Genomics 2005, 15:513–522

Keywords: OATP1B1, SNP, pravastatin, atorvastatin, cerivastatin, simvastatin, *SLCO1B1*

^aLaboratory of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan and ^bR & D Division, Pharmaceutical Group, Nippon Kayaku Co. Ltd., Tokyo, Japan.

Sponsorship: This work was supported by grants-in-aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (Health and Labour Sciences Research Grants, Research on Human Genome, Tissue Engineering; Health and Labour Sciences Research Grants, Risk Analysis Research on Food and Pharmaceuticals), Tokyo, Japan.

Correspondence and requests for reprints to Kan Chiba, PhD, Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Inohana 1-8-1, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan. Tel/fax: +81-43-226-2893; e-mail: kchiba@p.chiba-u.ac.jp

Received 24 September 2004 Accepted 21 April 2005

Introduction

For hepatic eliminating drugs, uptake into hepatocytes from the portal vein is a prerequisite step for subsequent metabolism and/or biliary excretion. Many transporters are expressed at the basolateral membrane of hepatocytes, such as organic anion-transporting polypeptides, organic anion transporters, organic cation transporters and sodium-dependent taurocholate transporting polypeptide [1]. Among them, OATP1B1 (gene, *SLC21A6/SLCO1B1*), also known as OATP-C, liver specific transporter-1 [2] or OATP2 [3], plays a crucial role in the hepatic uptake of a variety of structurally divergent compounds [4]. OATP1B1 can transport endogenous and a wide variety of exogenous substances, such as pravastatin [3], benzylpenicillin [5], bromosulfophtalein [6], [D-penicil-

lamine^{2,5}]enkephalin, BQ-123 [7], methotrexate [8], rifampicin [9], cerivastatin [10] and rosuvastatin [11]. Accordingly, genetic polymorphisms of *SLCO1B1* could give rise to remarkable alteration of pharmacokinetics of certain drugs if they are substrates of this transporter.

Tirona *et al.* [8] first reported 16 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and haplotypes designated as *SLCO1B1*1b* to **14* and the effects of those variant alleles on the transporting activity of OATP1B1 determined by using a transient expression system of HeLa cells. They found that six of these variant alleles, including *SLCO1B1*5*, reduced the transporting activity of OATP1B1 for estradiol-17 β -D-glucuronide and estrone-3-sulfate to less than 50% of that in the case of

*SLCO1B1*1a* (reference allele). Based on their findings, they suggested that *SLCO1B1*5* represents a heretofore unrecognized factor influencing drug disposition since the frequency of this allele is relatively high in European-Americans [8]. In accordance with their suggestion, Mwinyi *et al.* [12] recently reported that *SLCO1B1*5* remarkably decreased the non-renal clearance of pravastatin in Caucasian subjects. Contradicting these findings, however, Nozawa *et al.* [13] reported that *SLCO1B1*5* did not alter the transporting activity of OATP1B1 for estrone-3-sulfate when it was expressed in HEK 293 cells. Therefore, controversy remains regarding the effects of this variant allele on the activity of OATP1B1. On the other hand, in the same report, Nozawa *et al.* [13] also described a novel haplotype of *SLCO1B1* possessing 388A > G in addition to the mutation of *SLCO1B1*5* (521T > C), which is designated *SLCO1B1*15*. Since the frequency of this allele is relatively high in the Japanese population [13], this variant allele of *SLCO1B1* could represent a factor influencing drug disposition in Japanese or other Asian subjects. In fact, Nishizato *et al.* [14] subsequently reported that *SLCO1B1*15* significantly reduced non-renal clearance of pravastatin in Japanese subjects. However, there have been no reports on the effect of *SLCO1B1*15* on the transporting activity of OATP1B1 determined by using a cDNA expression system.

In the present study, we examined the effects of *SLCO1B1*5* and **15* on the functional properties of OATP1B1 using transiently expressed systems of HeLa and HEK293 cells with typical substrates of OATP1B1, estradiol-17 β -D-glucuronide and estrone-3-sulfate. We also examined the effects of *SLCO1B1*15* + *C1007G*, an allele possessing 1007C > G in addition to the mutation of *SLCO1B1*15* (388A > G and 521T > C), which was found in a Japanese patient with hypercholesterolemia who experienced muscle pain and loss of muscle strength after taking pravastatin. In addition, we studied the effects of these variant alleles on the transporting activity of OATP1B1 for pravastatin, atorvastatin, cerivastatin and simvastatin using a HPLC tandem mass spectrometry. Moreover, the effects of these variant alleles on the intracellular localization of OATP1B1 protein in HeLa and HEK293 cells were also studied.

Methods

Reagents

[³H]-Estrone-3-sulfate ammonium salt (1702 GBq/mmol) and [³H]-estradiol-17 β -D-glucuronide (1498.5 and 1665 GBq/mmol) were purchased from PerkinElmer Life Science, Inc. (Boston, Massachusetts, USA). Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit and pcDNA3.1/Zeo were obtained from Invitrogen (Carlsbad, California, USA). Pravastatin, atorvastatin, cerivastatin and simvastatin were kindly donated by Sankyo Co. (Tokyo, Japan).

Rabbit anti-human LST-1 (OATP1B1) antibody was purchased from Alpha Diagnostic International, Inc. (San Antonio, Texas, USA). All other reagents were commercially available and of reagent grade. HEK293 cells were purchased from Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan). HeLa cells were kindly donated by Dr. Tomohito Kakegawa, Department of Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University.

Full-length cDNA cloning

Full-length human OATP1B1 (also known as LST-1, OATP2 and OATP-C, *gene SLC21A6/SLCO1B1*) coding sequences corresponding to nucleotides 67-2247 of GeneBank accession No. AF205071 was amplified from human liver cDNA using the primer pair 5'-AATC-CAGGTGATTGTTTCAAACCTGAGCATC-3' (forward) and 5'-TGGAAACACAGAAGCAGAAGT-3' (reverse). The polymerase chain reaction (PCR) was performed using KOD-Plus-DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan) according to the following schedule: 2 min denaturation/activation at 94°C, followed by three cycles with 30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing at 66°C, 90 s elongation at 68°C, three cycles with 30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing at 63°C, 90 s elongation at 68°C, three cycles with 30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing at 60°C, 90 s elongation at 68°C, three cycles with 30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing at 57°C, 90 s elongation at 68°C, and, subsequently, 28 cycles with 30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing at 54°C, 105 s elongation at 68°C, and a final elongation at 68°C for 3 min. The amplicon was subcloned into pCR-Blunt II-TOPO vector and the sequence was verified as coding *SLCO1B1*1b* using dye terminator sequencing (CEQ2000XL DNA Analysis System, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA). *SLCO1B1*1b* cDNA, located between *KpnI* and *NotI* multiple cloning sites, was subcloned into pcDNA3.1/Zeo.

Site-directed mutagenesis

Point mutations were introduced into *SLCO1B1*1b*/pcDNA3.1/Zeo using KOD-Plus DNA polymerase followed by digestion of the template DNA with *DpnI*. Oligonucleotides containing 388A > G and 521T > C were used to create *SLCO1B1*1a* and *SLCO1B1*15* expression vectors, respectively. 521T > C was also introduced into *SLCO1B1*1a* vector in order to create *SLCO1B1*5* expression vector. Similarly, 1007C > G mutated vectors were constructed from *SLCO1B1*1a*, *SLCO1B1*1b*, *SLCO1B1*5* and *SLCO1B1*15* vectors. The presence of the mutations was verified by full sequencing. Obtained *SLCO1B1* variant vectors are shown in Table 1. Primers used for site-directed mutagenesis were as follows: A388G, 5'-GAAACTAATATCAATTCATCA-GAAAATTC-3' (forward) and 5'-GAATTTTCTGATGATTTGATATAGTTTC-3' (reverse); T521C, 5'-CATG-TGGATATATGCGTTCATGGGTA-3' (forward) and

Table 1 *SLCO1B1* allelic variants prepared by site-directed mutagenesis

	Mutation (amino acid substitution)		
	A388G (Asn130Asp)	T521C (Val174Ala)	C1007G (Pro336Arg)
*1a	A	T	C
*1b	G	T	C
*5	A	C	C
*15	G	C	C
*1a + C1007G ^a	A	T	G
*1b + C1007G ^a	G	T	G
*5 + C1007G ^a	A	C	G
*15 + C1007G	G	C	G

^aThese alleles have not been reported as naturally occurring variants.

5'-TACCCATGAACGCATATATCCACATG-3' (reverse); C1007G, 5'-CATCCTTACTAATCGCCTGTATGTTA-TG-3' (forward) and 5'-CATAACATACAGGCGATTAG-TAAGGATG-3' (reverse). The PCR site-directed mutagenesis was performed under the following conditions: 2 min denaturation/activation at 94°C followed by 12 cycles with 20 s denaturation at 95°C, 30 s annealing at 50°C and 8 min elongation at 68°C.

Cell culture and expression

For transient expression, the transfection of plasmids into HEK293 cells or HeLa cells was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or Lipofectamine Plus (Invitrogen), respectively, according to the manufacturer's protocol. Briefly, HEK293 cells seeded at a density of $2-4 \times 10^5$ cells per well in a poly-D-lysine coated 12-well plate were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and transfected with complexes of 1.5 µg of plasmid and 3 µl of Lipofectamine 2000 reagents diluted in OPTI-MEM I (Invitrogen). HeLa cells seeded at $1-1.2 \times 10^5$ cells per well in a 12-well plate were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and penicillin-streptomycin. At 1 day after seeding, the cells were exposed to antibiotics-free DMEM containing serum and then transfected with complexes of 0.5 µg of plasmid, 3 µl of Lipofectamine and 2 µl of Plus reagent in DMEM. At 3 h after the initiation of transfection, the medium was changed to complete RPMI-1640 medium. At 1 day prior to assays, cells were treated with sodium butyrate to enhance the expression of OATP1B1 proteins. HEK293 cells and HeLa cells transfected with the pcDNA3.1 vector alone were used to obtain background activity (termed mock). The expression of OATP1B1 was verified by reverse transcriptase (RT)-PCR.

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted by using Trizol reagent (Invitrogen) from transfected cells that had been exposed to sodium butyrate for 1 day. After treatment with DNase I (TaKaRa, Kyoto, Japan), cDNA synthesis was performed by using Ready-To-Go RT-PCR beads (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, New Jersey, USA) with oligo d(T)₁₂₋₁₈ primers and 1 U of RNaseOUT (Invitrogen)

according to the manufacturer's protocol. Then, the PCR reaction was performed using Ex-Taq (TaKaRa) as follows: 2 min denaturing at 94°C, 37 cycles with 15 s denaturing at 94°C, 30 s annealing at 49°C, 40 s elongation at 72°C, and a final elongation for 1 min at 72°C. The specific primer pairs for OATP1B1 designed by Tamai *et al.* [15] and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) were as follows: OATP1B1, 5'-TGTCATT-GTCCTTTTACCTATTAT-3' (forward) and 5'-TGTAAGTTATTCATTGTTTCCAC-3' (reverse); GAPDH, 5'-TGCACCACCAACTGCTTA-3' (forward) and 5'-GG-ATGCAGGGATGATGTTTC-3' (reverse). Products were run with 3% agarose gel. *SLCO1B1**1b/pcDNA3.1 vector and distilled water were used as templates for positive and negative controls, respectively.

Transport assays

For transport assays, the transfected cells in 12-well plates were treated with sodium butyrate for 1 day. The medium was changed to DMEM free from both antibiotics and serum without a substrate. To assess transport, the medium was removed and the same medium containing a substrate was added. The monolayers were incubated for 1-5 min depending on the substrate, and then cells were rapidly washed once or twice with ice-cold DMEM containing 5% FBS and three times with ice-cold DMEM. For [³H]-labeled substrates, cells were lysed in 500 µl of 0.2% sodium dodecyl sulfate, and 400-µl aliquots were transferred to scintillation vials and 25-µl aliquots of cell lysate were used to determine protein concentrations by the method of Lowry with bovine serum albumin (BSA) as a standard. Radioactivity was measured by a liquid scintillation counter (LSC 6100, Aloka Co., Tokyo, Japan). For un-radiolabeled substrates, 500 µl of ice-cold solution consisting of sodium acetate (pH 4.5; 10 mM)-acetonitrile-methanol (2:1:1, v/v/v) was added, and the solution containing cells was transferred to a centrifuge tube and then the substrate accumulated in cells was extracted by sonication for 10 min at 4°C. After centrifugation at 17 000g for 10 min at 4°C, a 400-µl aliquot of the supernatant was transferred to Ultrafree-MC (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) and filtered by centrifugation at 5000g for 5 min at 4°C, and the obtained filtrate was stored at -80°C until