

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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

(課題番号 H17-ファーマコ-002)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 乾 賢一

分担研究者 山岡 義生

分担研究者 小川 修

平成19 (2007) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

ゲノム情報を活用した薬物トランスポータ発現量予測 システムの構築とテーラーメイド薬物療法への応用	1
---	---

II. 分担研究報告

1. 肝臓がんに対する摘除術の施行と肝薬物トランスポータの発現・遺伝子多型解析 山岡 義生	13
2. 腎臓がんに対する摘除術の施行とゲノム情報と臨床データの相関解析 小川 修	19

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	29
-----------------	----

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総括研究報告書

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

主任研究者	乾 賢一	京都大学医学部附属病院教授・薬剤部長
研究協力者	桂 敏也	京都大学医学部附属病院助教授・副薬剤部長
	増田 智先	京都大学医学部附属病院薬剤部・講師
	寺田 智祐	京都大学医学部附属病院薬剤部・助手
	本橋 秀之	京都大学医学部附属病院薬剤部・助手
	上井 優一	京都大学医学部附属病院薬剤部・助手

【研究要旨】

近年、薬物トランスポータ発現量の個体差が、臨床効果の変動因子として重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。しかし、種々薬物トランスポータの発現制御機構並びに発現量の個体差を規定する因子については不明の点が多い。昨年度は、ヒト消化管における薬物トランスポータの発現解析、ペプチドトランスポータ（PEPT1）のプロモーター解析、薬物トランスポータの輸送解析を行い、上述した問題点解決のための基礎情報収集に努めた。本年度は、昨年度の研究成果をさらに発展させる形で、（1）有機イオントランスポータのプロモーター解析、（2）絶食による PEPT1 発現誘導のメカニズム解明、（3）H⁺/有機カチオンアンチポータ（MATE）の cDNA クローニングと分子特性の解析に取り組んだ。

腎尿細管上皮細胞の側底膜に発現する有機イオントランスポータ（OCT2、OAT1、OAT3）のプロモーター解析を行った。その結果、OCT2 では USF1、OAT1 では HNF4 α 、OAT3 では CREB-1、ATF-1 の各転写因子が、それぞれのトランスポータの基礎発現に大きな役割を果たしていることが判明した。また OAT3 のプロモーター活性は、PKA によるリン酸化により活性化された CREB-1 や ATF-1 によって促進された。

PEPT1 の絶食による発現誘導に対する分子機構を明らかにするため、核内受容体 PPAR α に注目し解析を加えた。PPAR α の合成リガンドである WY-14643 は PEPT1 の機能や発現を上昇させた。さらに PPAR α 遺伝子欠損動物では、絶食による PEPT1 の発現誘導は認められなかった。従って、PPAR α が絶食時の PEPT1 発現誘導に関与していることが判明した。

腎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ポータ（MATE1 及び MATE2-K）の cDNA クローニングに成功した。ラット MATE1 は主に腎臓に発現し、逆向きの H⁺勾配を駆動力として種々のカチオン性薬物（シメチジン（H₂ ブロッカー）、メトホルミン（糖尿病治療薬）、セファレキシン（抗生物質））などを輸送することが判明した。またヒト MATE1 や MATE2-K は、白金系抗がん剤であるオキサリプラチンを輸送したが、シスプラチンは輸送せず、MATEs による排泄の有無が白金系抗がん剤の腎毒性発現機序の一部に関与していることが示唆された。

これらの研究成果は、ゲノム情報を活用した薬物トランスポータ発現量予測システム構築のための有用な基盤になると考えられる。

【分担研究者】

1. 山岡義生・田附興風会医学研究所 北野病院・
病院長

2. 小川 修・京都大学医学部附属病院・教授

A. 研究目的

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

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

動因子として着目したものではない。

本研究は、ゲノム情報を駆使することによって、薬物トランスポータの発現量を予測できる新システムを構築し、その臨床的有用性について明らかにすることを最終目標としている。第2年度である今年度は、初年度に引き続き小腸及び腎薬物トランスポータの転写制御機構の解明を行うと共に、これまで分子の実体が不明であった腎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ポータ (MATE) の cDNA クローニングに取り組み、臓器分布、輸送機能特性並びにプロモーター解析を行い、上記目標を達成するための基礎情報の収集を試みた。

B. 研究方法

本年度は3年計画(平成17年度～平成19年度)の第2年度に当たり、(1)薬物トランスポータの転写制御機構の解析、(2)MATE1のcDNAクローニングと、機能・発現解析を行った。

1) 薬物トランスポータの転写制御機構の解析

前年度に解析が完了しなかった、ヒト有機カチオントランスポータ (OCT2)、有機アニオントランスポータ (OAT3) の基礎転写活性調節を精査した。また新たに OAT1 のレポーターコンストラクトを pGL3-Basic を用いて作成し、プロモーター解析を行った。転写活性は、各コンストラクトを腎臓由来の OK 細胞、LLC-PK₁ 細胞、HEK293 細胞に一過性に発現させ、ルシフェラーゼアッセイにより測定した。また転写因子のシスエレメントへの結合実験は、ゲルシフトアッセイにより行った。さらに小腸 PEPT1 の絶食における発現調節機構について、核内受容体 PPAR α に焦点を当てながら、ヒト培養腸上皮細胞 Caco-2 や PPAR α 遺伝子欠損マウスを用いて解析した。

2) MATE1 の cDNA クローニングと発現・機能解析

2005 年に Otsuka らにより報告されたヒト並びにマウス multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1) のアミノ酸配列を参考にして、ラット (r) MATE1 の cDNA を単離した。Northern blotting やリアルタイム PCR 法により発現臓器や腎内分布を同定した。さらに一過性発現系や安定発現細胞を用いて、MATE1 の輸送機能特性を精査した。また、分担研究者 (小川) らと共に単離したヒト (h) MATE1 及び hMATE2-K の発現ベクターをリポフェクション法によりヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に導入した。ト

ランスフェクション2日後に、白金系化合物含有メディアウム中でインキュベーションし、細胞内白金蓄積量を Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry 法により測定した。

(倫理面への配慮)本研究は、ヘルシンキ宣言(1975年、東京総会で修正)を尊重し計画されたものであり、対象患者個人のプライバシーをはじめとする人権擁護を優先する。すなわち、1)自由意思による同意が得られた場合にのみ実施対象とすること、2)同意した場合でも随時撤回でき、それによる不利益を受けることはないこと、3)血液や組織由来の核酸が他の目的に使用されないこと、4)遺伝子解析結果を含むすべての検査結果については守秘義務を守ること、5)研究成果の発表に際しては個人が特定できない方法でのみ行うこと、6)実施対象者の個人識別情報は連結可能匿名化方式で厳重に管理・保護されること、を遵守する。本研究では、薬物トランスポータ遺伝子の解析結果と薬物動態・薬物毒性の解析結果との比較解析を行うため、連結可能匿名化方式での管理・保護が必要と考えられる。摘出組織試料は、本研究のために採取するものではなく、消化器がんの外科的治療により摘出した組織の一部を使用するものである。遺伝カウンセリングは原則として行わないが、対象患者個人の「知る権利」及び「知らないでいる権利」を保護するため、患者自身の要望に応じ実施することとする。なお、本研究計画の実施にあたり、「ヒト組織を用いた薬剤性臓器障害発現機序の解明と薬剤毒性発現スクリーニング法の開発に関する研究」(承認日:平成14年8月20日、追加承認日:平成16年3月15日、追加承認日:平成18年9月21日)、「薬物の体内動態・薬効の個人差予測に関する臨床研究」(承認日:平成16年1月19日、追加承認日:平成17年5月26日、追加承認日:平成18年1月11日)が、京都大学医学部・医の倫理委員会において厳正に審議され承認されている。なお、上記ヒトを対象とした遺伝子解析研究計画並びに審査・承認過程は、平成13年4月1日に施行された文部科学省・厚生労働省・経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守するものである。

認日:平成16年3月15日、追加承認日:平成18年9月21日)、「薬物の体内動態・薬効の個人差予測に関する臨床研究」(承認日:平成16年1月19日、追加承認日:平成17年5月26日、追加承認日:平成18年1月11日)が、京都大学医学部・医の倫理委員会において厳正に審議され承認されている。なお、上記ヒトを対象とした遺伝子解析研究計画並びに審査・承認過程は、平成13年4月1日に施行された文部科学省・厚生労働省・経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守するものである。

C. 研究成果

1) 薬物トランスポータの転写制御機構解析

1-1) OCT2 の基礎転写機構

5'RACE法によりヒトOCT2の転写開始部位が翻訳開始部位より385bp上流に存在することが判明した。レポーターアッセイは有機カチオン輸送系の発現していることが報告されているLLC-PK₁を用いて行った。OCT2プロモーター領域のdeletion analysisの結果、転写開始部位より上流100bp付近に基礎発現に重要なシスエレメントが存在する可能性が示唆された。この領域には基礎転写に関与するCCAAT box やE-box と相同性の高い領域が隣接して存在していた。そこでこれらの領域を含むオリゴDNAを用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、E-boxにのみ転写因子の結合していることがわかった。そこで、E-boxに結合することが知られている転写因子Upstream Stimulatory Factor (USF)1並びにUSF2に対する抗体を用いてスーパーシフトアッセイを行っ

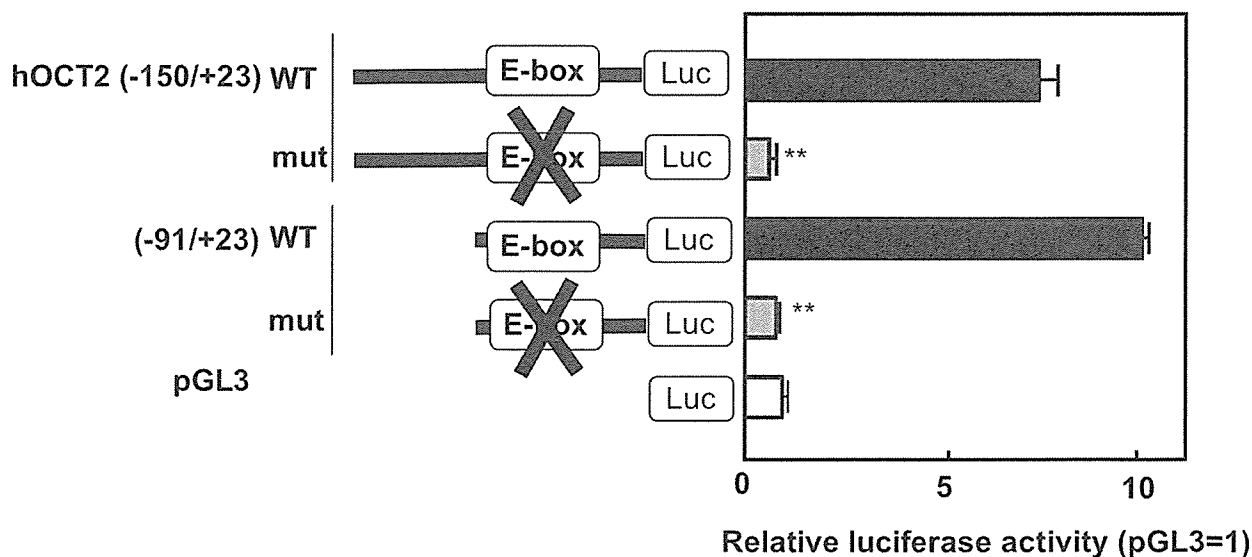


Fig. 1. E-box の変異の OCT2 プロモーター活性に及ぼす影響

たところ、USF1 が E-box に結合していることが判明した。さらに USF1 の関与を機能的に確認するため、E-box に変異を導入しルシフェラーゼ活性を測定したところ、活性は完全に消失した (Fig. 1)。さらに OCT2 のプロモーター活性は、USF1 を過剰発現させることによって投与量依存的に促進された。以上のことから、OCT2 の基礎転写は、E-box を介した USF1 によって制御されていることが明らかになった。

1-2) OAT1 の基礎転写機構

5'RACE 法並びに NCBI データベースより、ヒト OAT1 の転写開始部位が翻訳開始部位より 308bp 上流に存在することが判明した。転写開始部位より約 3 kb 上流のプロモーター領域を単離し、レポーターコンストラクトを作製した。まず有機アニオン輸送系の発現している OK 細胞、並びに発現していない HEK293 細胞と Caco-2 細胞を用いて、プロモーター活性を評価したところ、OK 細胞でのみ顕著なプロモーター活性が認められた。次に、OAT1 の転写活性を制御している転写因子の検索を行うため、肝臓、腎臓、小腸などに発現している Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)1 α 、HNF-1 β 、HNF4 α に焦点を当て検討を加えた。その結果、HNF4 α のみ OAT1 プロモーター活性を顕著に促進させた。次に、HNF4 α の結合領域を探索するため、各種 deletion constructs を用いて HNF4 α による活性化率を評価したところ、-875~-862 の領域に存在する direct repeat 2 (DR-2) と、-123~-104 の領域に存在する inverted repeat 8 (IR-8) が HNF4 α の結合領域として機能していることが示唆された。DR2 は典型的な HNF4 α の結合部位として知られているが、IR-8 は最近見いだされた新しいコンセンサス配列である。そこで、これらの領域と HNF4 α との相互作用について検討を加えた。HNF4 α を過剰発現させた OK 細胞から核抽出液を調製し、DR-2 あるいは IR-8 を含むオリゴ DNA を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、いずれにも HNF4 α が結合していることがわかった。DR-2 並びに IR-8 の変異体では、HNF4 α による促進は減少した。従って、OAT1 遺伝子の基礎転写には、IR-8 や DR-2 を介した HNF4 α の制御が重要な役割を果たしていることが判明した (Fig. 2)。

1-3) OAT3 の基礎転写機構

OAT3 プロモーター領域の deletion analysis の結果、転写開始部位の上流 77 から 214 bp の間の領域が、OAT3 の転写活性に重要であることが明らかとなった

た。この領域において転写因子の結合部位を検索したところ、完全に保存された cAMP-response element (CRE) の存在することがわかった。CRE に変異を導入することにより転写活性は約 1/3 に減少し、OAT3 の転写調節に CRE の関与していることが示唆された。

CRE には複数の転写因子の結合することが知られていることから、次に OAT3 プロモーター領域の CRE に結合する転写因子の同定を試みた。ゲルシフトアッセイによるスーパーシフトアッセイの結果、CRE-binding protein (CREB)-1 及び activating transcription factor (ATF)-1 が結合することが判明した。また、CREB-1 や ATF-1 は PKA によってリン酸化を受けることで、標的遺伝子の転写を活性化することが知られている。そこで、PKA の活性化剤である 8-Br-cAMP を用いて、PKA の OAT3 転写活性に与える影響を調べた。8-Br-cAMP 処理により OAT3 の転写活性は増大し、CRE が欠失したコンストラクトではこの効果は消失した。また、8-Br-cAMP 処理によってリン酸化された ATF-1 と CREB-1 のタンパク量が増加した。従って、OAT3 の発現制御には CREB-1 や ATF-1 が CRE を介して重要な役割を果たしており、これら転写因子が OAT3 の構成的な遺伝子発現だけでなく、PKA による誘導的な遺伝子発現にも関与していることが明らかになった (Fig. 2)。

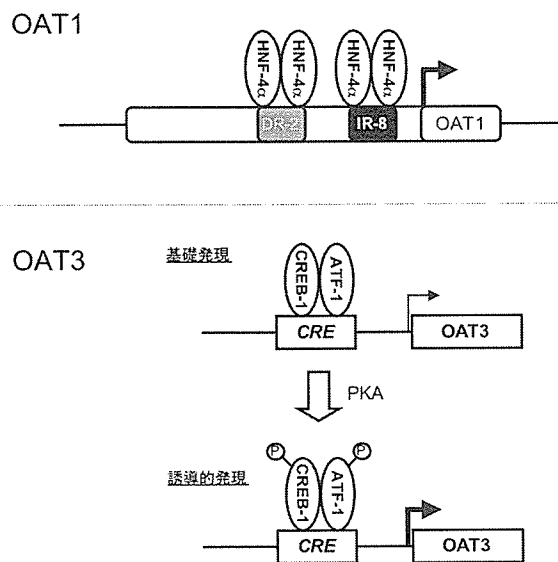


Fig. 2. OAT1 と OAT3 の転写制御機構

1-4) 絶食時における小腸 PEPT1 の発現誘導機構

絶食は小腸 PEPT1 の mRNA 及び蛋白レベルを上昇させ、PEPT1 の基質薬物の体内動態にも影響を及

ばすことが明らかとなっている。そこで、絶食時における PEPT1 発現誘導のメカニズムについて検討を行った。PEPT1 の基礎発現や臓器特異的な発現に関与している転写因子 Sp1 や Cdx2 は、絶食によっても顕著な上昇は認められず、PEPT1 誘導には関与していないと考えられた。肝臓などの組織において、脂肪酸β酸化系酵素の誘導など、絶食に対する適応反応に重要な役割を果たしている核内受容体 PPARα は、小腸にも発現している。そこで、PEPT1 誘導における PPARα の関与について検討を加えた。48 時間絶食させたラットでは、小腸 PPARα mRNA の発現レベルが上昇しており、PPARα の内因性リガンドである血中遊離脂肪酸濃度の顕著な上昇を伴っていた。Caco-2 細胞を PPARα の合成リガンドである WY-14643 で処理したところ、PEPT1 mRNA レベルが上昇し、PEPT1 の輸送活性も増大した。さらに、ラットに WY-14643 を経口投与した結果、小腸 PEPT1 の mRNA レベルが上昇した。最後に、PPARα ノックアウトマウスを用いた検討では、絶食による小腸 PEPT1 の誘導は完全に消失した。一方、腎臓では野生型およびノックアウトマウスともに絶食による PEPT1 誘導は観察されなかった。以上の結果から、PPARα が絶食による小腸 PEPT1 誘導に主要な役割を果たしていることが明らかとなった (Fig. 3)。

2) MATE1 の cDNA クローニングと発現・機能解析

2-1) rMATE1 の構造・臓器分布

2005 年に、腎尿管上皮細胞の刷子縁膜に発現す

る有機カチオントランスポータとして報告されたヒト及びマウス MATE1 の塩基配列を参考にして、rMATE1 cDNA を単離した。rMATE1 は 566 個のアミノ酸から構成され、12 回膜貫通型タンパクであることが推察された (Fig. 4)。rMATE1 mRNA は腎臓に高発現しており、腎内では近位尿管細管及び直尿管に局限していた。また腎臓以外の臓器では、胎盤、膵臓、脾臓などに発現していたが、ヒトやマウスで発現の認められた肝臓では発現していなかった。また rMATE1 の C 末端アミノ酸部位に対する抗体を作製し、腎組織切片を用いて免疫組織染色を行ったところ、rMATE1 は近位尿管上皮細胞の刷子縁膜に局在していることが判明した。

2-2) rMATE1 の機能解析

rMATE1 を HEK293 細胞に一過性に発現させ、種々カチオン性化合物の取り込み実験を行った。H⁺ 有機カチオンアンチポータの典型的基質である tetraethylammonium (TEA) の取り込みは、基質濃度上昇に伴って飽和性を示し、Km 値は 570 μM と算出された。さらに、rMATE1 はカチオン性化合物である cimetidine、metformin、N¹-methylnicotinamide (NMN) 及び両性イオン型の cephalixin を輸送した (Fig. 4)。

TEA の取り込みは、細胞外 pH がアルカリ側において高く、NH₄Cl 処理による細胞内酸性化によって顕著に促進されたことから、逆向きの H⁺ 勾配が

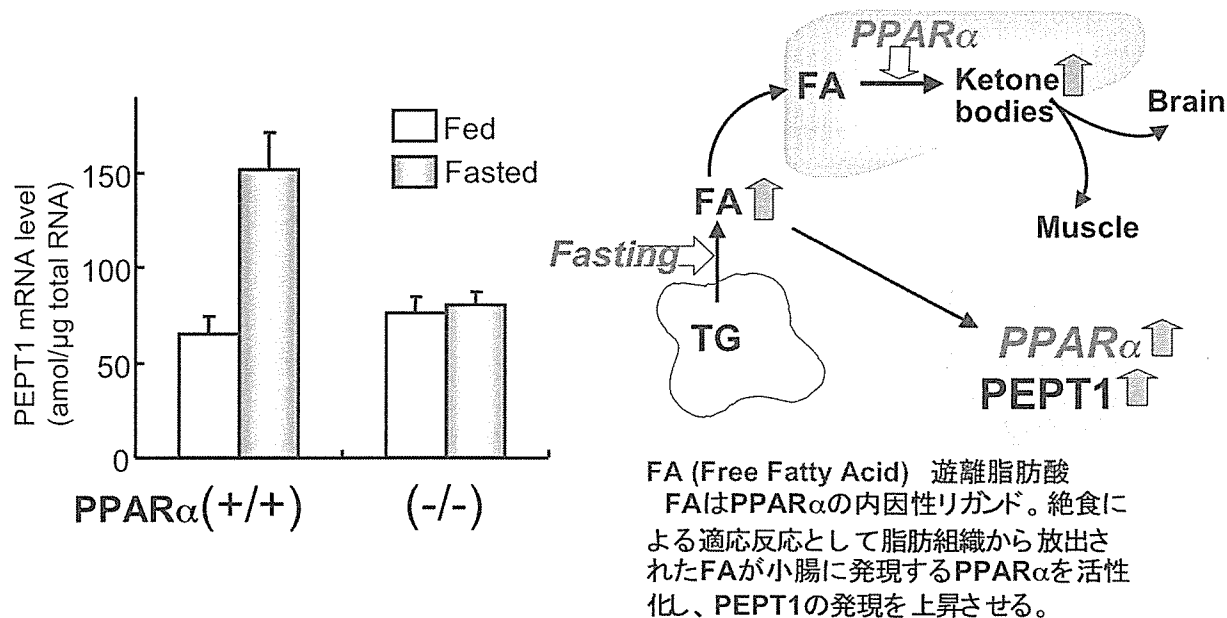


Fig. 3. 絶食による PEPT1 発現誘導のメカニズム

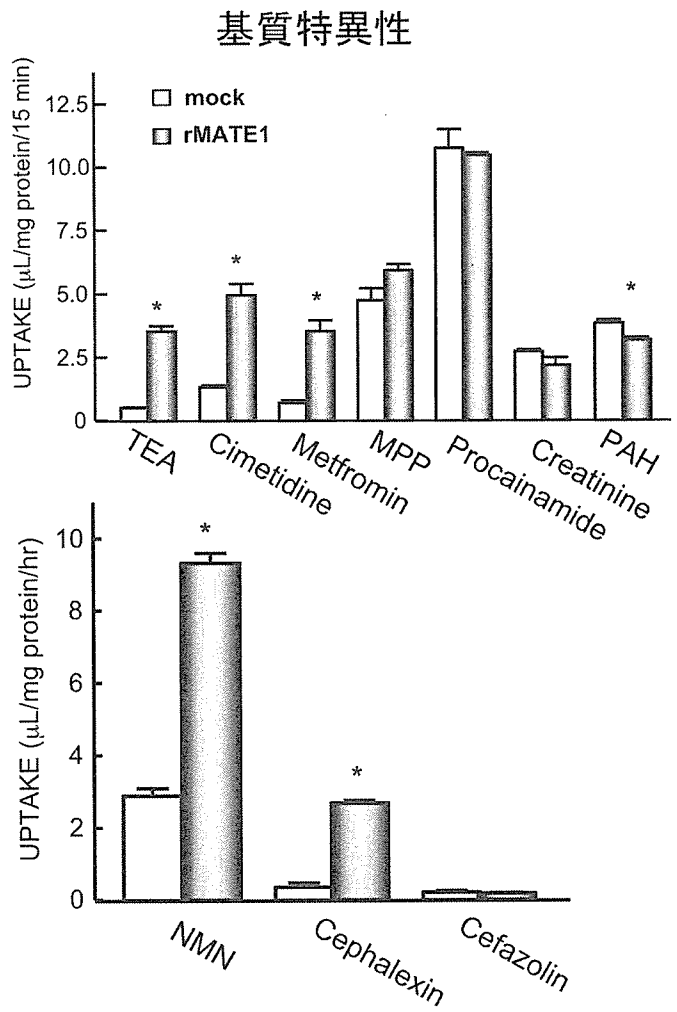
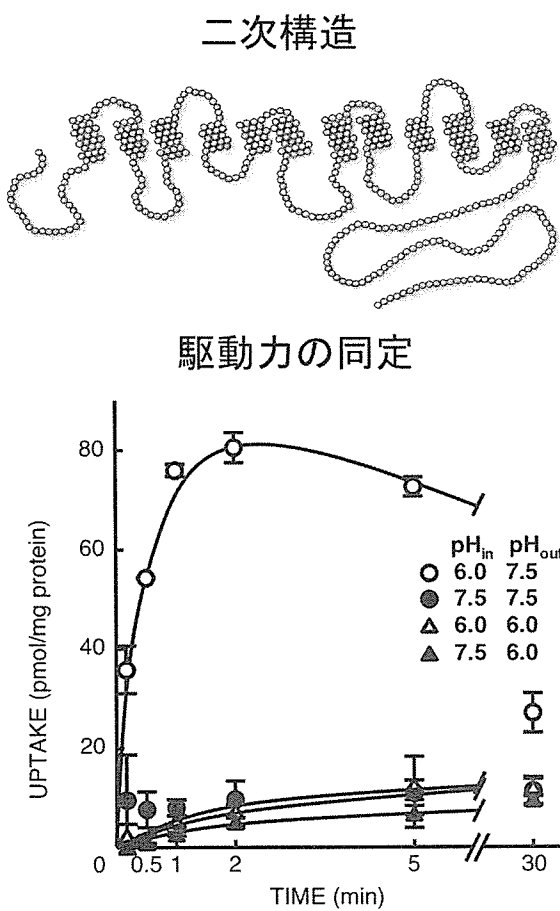


Fig. 4. rMATE1 の二次構造、駆動力並びに基質特異性

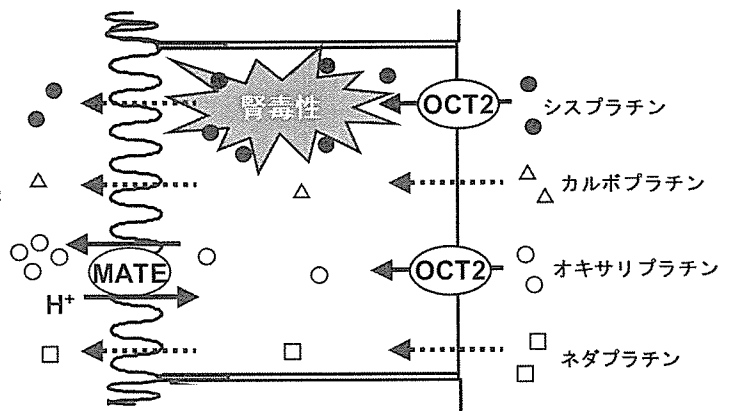
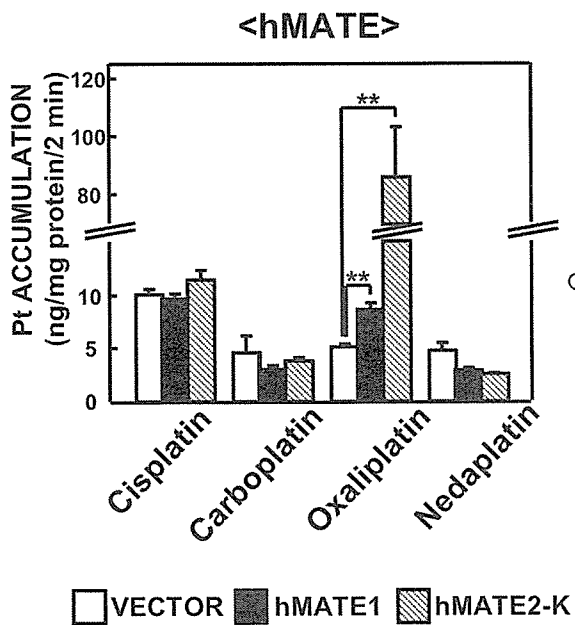


Fig. 5. MATEsによる白金系抗がん剤の輸送特性と腎毒性発現機構

rMATE1 の駆動力として機能していることが推察された。そこで、rMATE1 の駆動力を直接証明するため、rMATE1 安定発現細胞から膜小胞を作製し、取り込み実験を行った。その結果、逆向きの H⁺勾配存在下のみで TEA 取り込みのオーバーシュート現象が認められた (Fig. 4)。さらにそのオーバーシュートは、プロトノフォアである FCCP 共存によって消失したことから、rMATE1 は逆向き H⁺勾配を駆動力とするトランスポータであることが判明した。また rMATE1 を介した TEA 取り込みは膜電位の影響を受けなかったことから、H⁺と TEA の化学量論比は 1:1 であることが推察された。

2-3) hMATE1 並びに hMATE2-K の腎毒性との関係

次に hMATE1 および hMATE2-K の機能と腎毒性との関連について、白金系抗がん剤を用いて検討した。高い腎蓄積と強い腎毒性を呈する白金系抗がん剤シスプラチンと、逆に低い腎蓄積性で腎毒性を殆ど示さないオキサリプラチンはともに、側底膜に発現する hOCT2 によって輸送された。一方、刷子縁膜側の輸送では、オキサリプラチンは両トランスポータにより顕著に輸送されたが(輸送活性:hMATE2-K > hMATE1)、シスプラチンはいずれのトランスポータによっても輸送されなかった (Fig. 5)。従って、オキサリプラチンは OCT2 によって腎尿細管に取り込まれるものの、MATEs によって効率的に尿中へ分泌されるため、腎蓄積性・腎毒性を示さないことがわかった (Fig. 5)。一方、シスプラチンでは、MATEs による分泌を受けないため腎臓に蓄積し、その結果腎毒性を惹起することが示唆された (Fig. 5)。

D. 考察

申請者は、これまで種々病態モデル動物(腎不全、甲状腺機能障害、高尿酸血症など)を用いて、様々な薬物の体内動態と薬物トランスポータの発現変動との関連について検討を加え、薬物トランスポータの発現量の変化が、薬物体内動態パラメーター(腎クリアランス、AUC など)の変動とよく対応していることを明らかにしてきた。さらに研究対象をヒトへと発展させ、メサンギウム増殖性糸球体腎炎患者では、OAT3 mRNA 発現量がアニオン性抗生物質セファゾリン排泄能の良好な予測因子となること、内因性カチオンである NMN の腎排泄には OCT2 発現量が影響していること、OAT1 mRNA が腎不全患者で減少することを、平成 15~16 年度に実施した厚生労働科学研究(長寿科学総合研究事業)の成果とし

て報告した。このように、薬物トランスポータ発現量の個体差が薬物体内動態の変動と密接に関連していることが明らかになってきたが、発現量の個体差を規定するメカニズムは言うに及ばず、小腸や腎薬物トランスポータの基本的な発現制御機構についてはほとんど情報がなかった。そこで、本研究事業において種々薬物トランスポータの転写制御機構の解明に着手し、初年度には小腸 PEPT1 の基礎並びに臓器特異的な発現機構を明らかにした。今年度は、腎臓に発現する OCT2、OAT1 並びに OAT3 の基礎発現機構の解明を試みた。

OCT2 では、-87 から-82 のプロモーター部位に存在する E-box に普遍的転写因子の一つである USF1 が結合し、OCT2 の基礎発現を制御していることが判明した。USF-1 は angiotensinogen、heme oxygenase-1、prolyl-4-hydroxylase (I)など、様々な遺伝子の基礎転写に重要な役割を果たしていることが知られている。E-box のコンセンサス配列は CANNTG であるが、中央の NN は多くの場合 GC 若しくは CG となっている。OCT2 プロモーター領域での E-box の配列は、CACGTG であり、塩基配列からもこの領域の重要性が支持される。葉酸の代謝に関与する thymidylate synthase 遺伝子の rSNP として E-box の変異が報告されているが、OCT2 のプロモーターにおいては、E-box の rSNP は見いだされていない(分担研究者小川の成果参照)。一方、USF1 の cSNP が、家族性高脂血症やインスリン感受性に関与していることが報告されており、USF1 の機能変化を伴う cSNP が間接的に OCT2 の発現量に影響を与えている可能性があり、今後の検討課題と考えられる。

OAT1 の基礎転写には、HNF4 α が大きく関与していることが判明した。HNF4 α は肝臓のみならず、小腸、膵臓、腎臓などにも発現しているが、HNF4 α の主要発現臓器である肝臓に比べて、腎臓における役割はほとんど解明されていなかった。OAT1 はネフロンセグメントのうち近位尿細管上皮細胞に局限しているが、HNF4 α もまた腎臓では近位尿細管にのみ発現していることが報告されており、HNF4 α は OAT1 の腎内分布を規定する重要な因子であると考えられる。MODY (若年発症成人型糖尿病)は常染色体優性の遺伝形式を示し、通常 25 才以下で発症することが知られているが、MODY1 の原因遺伝子として HNF4 α の変異が報告されている。MODY1 の患者では、OAT1 の発現が減少し薬物腎排泄が低下していることが推察されることから、次年度には HNF4 α の変異の OAT1 mRNA 発現に及ぼす影響に

ついて検討を進める予定である。

OAT3 では、-87 から-80 のプロモーター部位に存在する CRE に、CREB-1 や ATF-1 が結合し、OAT3 の基礎並びに誘導的な発現に関与していることが判明した。また Kikuchi らにより、OAT3 の転写制御には HNF1 α /1 β (-65 から-53 のプロモーター部位) が関与していることが報告され、複数の転写因子が OAT3 の発現に関与していることが明らかになりつつある。PKA による CREB-1、ATF-1 を介した OAT3 遺伝子発現の調節は本研究で初めて明らかになったものであり、*in vivo* においても OAT3 mRNA が PKA を活性化するホルモンなどによってダイナミックに制御されている可能性が考えられる。これまでの解析の結果、OAT3 mRNA 発現量に影響を及ぼす rSNP の同定には至っていないが、PKA を活性化する因子も、OAT3 mRNA 予測のためのバイオマーカーになりうる可能性が考えられる。

PEPT1 は、経口用 β -ラクタム抗生物質、抗ウイルス薬 (バラシクロビル、バルガンシクロビルなど)、ACE 阻害薬などペプチド類似薬物の腸管吸収において重要な役割を果たしている。これまでの研究により、PEPT1 は絶食によって発現が誘導されることが示されていたが、本研究において遊離脂肪酸を生理的リガンドとする PPAR α がその発現誘導に中心的な役割を果たしていることが判明した。絶食においては、小腸粘膜の管腔内への脱落が観察され、粘膜の萎縮や重量低下につながるが、PEPT1 発現量の増大によって、脱落した粘膜や分泌されたホルモンを効率的に再吸収し、生体内窒素の低下を最小限に保っているのかもしれない。さらに、食餌が再び与えられたときにペプチドの効率的な吸収を可能にしていることも考えられる。加えて、PPAR α はアミノ酸代謝に関わる肝臓の遺伝子発現を低下させ、全体としてアミノ酸の分解を抑制する方向に働くことも報告されており、絶食時に PPAR α がアミノ酸分解を抑制し、ペプチド吸収を増大させることで、生体内の窒素の喪失を最小限にすると考えることができる。PPAR α は臨床で広く使用されているフィブラート系高脂血症治療薬の標的分子であり、本薬物の投与によって PEPT1 の発現が変動している可能性が考えられる。今回、ラットにおいて WY-14643 の経口投与は小腸 PEPT1 を上昇させたが、ヒトにおいても PPAR α アゴニストの投与で同様の作用が見られるか現時点では不明であり、PPAR α アゴニストによる PEPT1 基質薬物の体内動態への影響、さらには治療効果への影響の有無を検討する必要があると考え

られた。

腎臓におけるカチオン性薬物の排泄は、側底膜に発現する膜電位依存性有機カチオントランスポーター (OCT) と、刷子縁膜に局在する H⁺/有機カチオンアンチポータによって営まれている。OCT は 1994 年に同定されて以来、輸送機能、発現・局在、cSNP に関する解析が行われ、種々の分子的並びに生化学的特性が明らかにされてきた。本研究事業においても、OCT の転写制御機構や rSNP 解析に取り組み、発現調節機構の分子・遺伝子情報を集積しつつある。一方、H⁺/有機カチオンアンチポータの分子実体は長年不明であり、個別化薬物療法を実践するための基礎情報が欠如していた。我々は、rMATE1 cDNA を新たに単離し、臓器分布、局在、機能特性などを解析することによって、MATE1 が H⁺/有機カチオンアンチポータとして機能していることを実証した。MATE1 は臨床上汎用されている、H₂-blocker cimetidine、ビグアナイド系糖尿病治療薬 metformin、経口用 β -ラクタム抗生物質 cephalixin を輸送した。

さらに hMATE の輸送機能解析より、hMATE1 および hMATE2-K の腎保護作用としての役割が提示された。すなわち腎毒性を発現しない白金系抗がん剤オキサリプラチンはシスプラチンと同様に hOCT2 によって輸送されるが、MATEs によっても輸送されることが判明した。したがって、MATEs による分泌機構がオキサリプラチンに対する腎保護作用として関与することが推察された。他方、シスプラチンによる腎毒性は、側底膜の OCT2 発現量が規定因子となることが動物実験によって明らかになった。したがって、有機カチオン輸送系が白金系抗がん剤の腎挙動を支配する因子となり、効果・副作用発現に影響することが考えられる。hMATE1 の発現を制御する rSNP も既に同定されており、今後更なる臨床応用への可能性が予想される (分担研究者小川の項参照)。

E. 結論

有機イオントランスポータの基礎転写機構について検討を加え、OCT2 には USF1 が、OAT1 には HNF4 α が、また OAT3 には CREB-1、ATF-1 が関与していることを実証した。PEPT1 の絶食時における発現誘導には、遊離脂肪酸をリガンドとする PPAR α が重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、ラット腎 H⁺/有機カチオンアンチポータ (rMATE1) を同定し、臓器分布、膜局在、基質認識特性など、基本的な分子特性を明らかにした。さ

らに hMATE1 及び hMATE2-K による白金系抗がん剤の輸送解析を通して、本薬剤の腎毒性発現機構には、MATEs による輸送が大きく寄与していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

得られた成果の中に健康被害情報に該当するものはない。

G. 研究成果発表

1. 論文発表

1. 寺田智祐：ペプチドトランスポーターPEPTs. “創薬動態 医薬品創製のための考え方と最新事情” 日本薬物動態学会編、東京、116-122 (2006)
2. Niida, A., Tomita, K., Mizumoto, M., Tanigaki, H., Terada, T., Oishi, S., Otaka, A., Inui, K. and Fujii, N.: Unequivocal synthesis of (Z)-alkene and (E)-fluoroalkene dipeptide isosteres to probe structural requirements of the peptide transporter PEPT1. *Org. Lett.*, **8**(4) 613-616 (2006)
3. Irie, M., Terada, T., Tsuda, M., Katsura, T. and Inui, K.: Prediction of glycylsarcosine transport in Caco-2 cell lines expressing PEPT1 at different levels. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.*, **452**(1), 64-70 (2006)
4. Asaka, J., Terada, T., Okuda, M., Katsura, T. and Inui, K.: Androgen receptor is responsible for rat organic cation transporter 2 (rOCT2) gene regulation but not for rOCT1 and rOCT3. *Pharm. Res.*, **23**(4) 697-704 (2006)
5. Shimakura, J., Terada, T., Shimada, Y., Katsura, T. and Inui, K.: The transcription factor Cdx2 regulates the intestine-specific expression of human peptide transporter 1 through functional interaction with Sp1. *Biochem. Pharmacol.*, **71**(11) 1581-1588 (2006)
6. Tsuda M., Terada, T., Irie, M., Katsura, T., Niida, A., Tomita, K., Fujii, N. and Inui, K.: Transport characteristics of a novel peptide transporter (PEPT1) substrate, antihypertensive drug midodrine, and its amino acid derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **318**(1), 455-460 (2006)
7. Noshiro, R., Anzai, N., Sakata, T., Miyazaki, H., Terada, T., Shin, H.J., He, X., Miura, D., Inui, K., Kanai, Y. and Endou, H.: The PDZ domain protein PDZK1 interacts with human peptide transporter PEPT2 and enhances its transport activity. *Kidney Int.*, **70**(2) 275-282 (2006)
8. Masuda, S., Terada, T., Yonezawa, A., Tanihara, Y., Kishimoto, K., Katsura, T., Ogawa, O. and Inui, K.: Identification and functional characterization of a new human kidney-specific H⁺/organic cation antiporter MATE2-K. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **17**(8) 2127-2135 (2006)
9. Terada, T., Masuda, S., Asaka, J., Tsuda M., Katsura, T. and Inui, K.: Molecular cloning, functional characterization and tissue distribution of rat H⁺/organic cation antiporter MATE1. *Pharm. Res.*, **23**(8), 1696-1701 (2006)
10. Ogasawara, K., Terada, T., Asaka, J., Katsura, T. and Inui, K.: Human organic anion transporter 3 gene is regulated constitutively and inducibly via a cAMP-response element. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**(1), 317-322 (2006)
11. Okuda, M., Kimura, N. and Inui K.: Interactions of fluoroquinolone antibacterials, DX-619 and levofloxacin, with creatinine transport by renal organic cation transporter hOCT2. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**(5) 432-436 (2006)
12. Shimakura, J., Terada, T., Saito, H., Katsura, T. and Inui, K.: Induction of the intestinal peptide transporter 1 expression during fasting is mediated via peroxisome proliferator-activated receptor α . *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **291**(5), G581-G586 (2006)
13. Yonezawa, A., Masuda, S., Yokoo, S., Katsura, T. and Inui, K.: Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and MATE family). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**(2), 879-886 (2006)
14. Terada, T. and Inui, K.: Gene expression and regulation of drug transporters in the intestine and kidney. *Biochem. Pharmacol.*, **73**(3), 440-449 (2007)
15. Tsuda, M., Terada, T., Asaka, J., Ueba, M., Katsura, T. and Inui, K.: Oppositely-directed H⁺ gradient functions as a driving force of rat H⁺/organic cation antiporter. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **292**(2) F593-F598 (2007)
16. Uwai, Y., Ida, H., Tsuji, Y., Katsura, T. and Inui,

- K.: Renal transport of adefovir, cidofovir, and tenofovir by SLC22A family members (hOAT1, hOAT3, and hOCT2). *Pharm. Res.*, **24**(4), 811-815 (2007)
17. Nishihara, K., Masuda, S., Ji, L., Katsura, T. and Inui, K.: Pharmacokinetic significance of luminal multidrug and toxin extrusion 1 in chronic renal failure rats. *Biochem. Pharmacol.*, **73**(9), 1482-1490 (2007)
 18. Asaka, J., Terada, T., Ogasawara, K., Katsura, T. and Inui, K.: Characterization of the basal promoter element of human organic cation transporter 2 (hOCT2) gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press.
 19. Asaka, J., Terada, T., Tsuda, M., Katsura, T. and Inui, K.: Identification of essential histidine and cysteine residues of H⁺/organic cation antiporter, Multidrug and Toxin Extrusion (MATE). *Mol. Pharmacol.*, in press.
 20. Ogasawara, K., Terada, T., Asaka, J., Katsura, T. and Inui, K.: Hepatocyte nuclear factor-4 α regulates the human organic anion transporter 1 gene in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, in press.
 21. Yokoo, S., Yonezawa, A., Masuda, S., Fukatsu, A., Katsura, T. and Inui, K.: Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agents-induced nephrotoxicity. *Biochem. Pharmacol.*, in press.
 22. Uwai, Y., Motohashi, H., Tsuji, Y., Ueo, H., Katsura, T. and Inui, K.: Interaction and transport characteristics of mycophenolic acid and its glucuronide via human organic anion transporters hOAT1 and hOAT3. *Biochem. Pharmacol.*, in press.
2. 学会発表
1. Asaka, J., Terada, T., Katsura, T. and Inui, K.: Functional characterization and tissue distribution of rat H⁺/organic cation antiporter MATE1. 1st Asia Pacific ISSX Meeting (May 2006, Jeju Island, Korea)
 2. Motohashi, H., Kishimoto, K., Katsura, T., Fukatsu, A. and Inui, K.: Expression levels of hOCT2 and renal excretion of N¹-methylnicotineamide in patients with renal disease. 1st Asia Pacific ISSX Meeting (May 2006, Jeju Island, Korea)
 3. 寺田智祐、津田真弘、桂 敏也、乾 賢一：低血圧症治療薬ミドドリンの消化管吸収におけるペプチドトランスポータ PEPT1 の役割。日本膜学会第 28 年会（2006 年 6 月、札幌市）
 4. 米澤 淳、増田智先、横尾幸子、西原久美子、桂 敏也、乾 賢一：白金系抗癌剤による尿細管選択的な毒性発現。第 49 回日本腎臓学会学術総会（2006 年 6 月、東京都）
 5. 小笠原健、寺田智祐、本橋秀之、桂 敏也、乾 賢一：ヒト有機アニオントランスポータ OAT3 の発現制御機構と rSNP 解析。第 49 回日本腎臓学会学術総会（2006 年 6 月、東京都）
 6. 寺田智祐、増田智先、朝賀純一、津田真弘、桂 敏也、乾 賢一：ラット H⁺/有機カチオン逆輸送体 (rMATE1) の遺伝子クローニングと機能解析。第 49 回日本腎臓学会学術総会（2006 年 6 月、東京都）
 7. Masuda, S., Terada, T., Yonezawa, A., Tanihara, Y., Katsura, T. and Inui, K.: A new human kidney H⁺/organic cation antiporter MATE2-K: cDNA cloning, tissue distribution and functional characterization. 第 12 回分子腎臓研究会（2006 年 9 月、東京都）
 8. 乾 賢一：小腸および腎薬物トランスポータの構造・機能と臨床的意義。長井長義記念シンポジウム（2006 年 9 月、徳島市）
 9. 米澤 淳、横尾幸子、増田智先、桂 敏也、乾 賢一：白金系抗癌剤による腎毒性発現機構：有機カチオントランスポータの関与と基質認識特性。第 16 回日本医療薬学会年会（2006 年 9 月、金沢市）
 10. 谷原悠子、増田智先、木村尚子、大澤理代、桂 敏也、藤本新平、稲垣暢也、乾 賢一：経口血糖降下薬メトホルミンの体内動態解析。第 16 回日本医療薬学会年会（2006 年 9 月、金沢市）
 11. 本橋秀之：腎疾患時における薬物トランスポータの変動。（シンポジウム）第 2 回創剤フォーラム若手研究発表討論会（2006 年 10 月、京都市）
 12. Asaka, J., Terada, T., Katsura, T. and Inui, K.: Functional promoter analyses of human organic cation transporter 2 (OCT2/SLC22A2). 2006

- AAPS Annual Meeting and Exposition (October 2006, San Antonio, USA)
13. Terada, T., Masuda, S., Asaka, J., Tsuda, M., Katsura, T. and Inui, K.: Molecular cloning and functional characterization of rat H⁺/organic cation antiporter (MATE1). 2006 AAPS Annual Meeting and Exposition (October 2006, San Antonio, USA)
 14. Masuda, S., Terada, T., Yonezawa, A., Tanihara, Y., Katsura, T. and Inui, K.: cDNA cloning and functional characterization of a novel H⁺/organic cation antiporter MATE2-K specifically expressed in the kidney. 2006 AAPS Annual Meeting and Exposition (October 2006, San Antonio, USA)
 15. Yonezawa, A., Nishihara, K., Yokoo, S., Masuda, S., Katsura, T. and Inui, K.: OCT2/SLC22A2 mediates renal accumulation of cisplatin, which causes nephrotoxicity. 2006 AAPS Annual Meeting and Exposition (October 2006, San Antonio, USA)
 16. 増田智先、寺田智祐、米澤 淳、谷原悠子、桂 敏也、乾 賢一：ヒト腎のみに発現する新規 H⁺/有機カチオンアンチポータ MATE2-K の cDNA クローニング、組織分布並びに機能解析. 第 28 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2006 年 11 月、静岡市)
 18. Masuda, S., Terada, T., Yonezawa, A., Tanihara, Y., Katsura, T. and Inui, K.: A novel human kidney-specific H⁺/organic cation antiporter MATE2-K: cDNA cloning, tissue distribution and functional characterization. Renal Week 2006 (November 2006, San Diego, USA)
 19. Yonezawa, A., Yokoo, S., Masuda, S., Katsura, T. and Inui, K.: Role of human organic cation transporters (hOCT and hMATE) in the cellular accumulation and toxicity of cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin. Renal Week 2006 (November 2006, San Diego, USA)
 20. 津田真弘、寺田智祐、朝賀純一、増田智先、桂 敏也、乾 賢一：ラット H⁺/有機カチオン逆輸送体(rMATE1)の機能解析、組織分布、並びに局在. 第 21 回日本薬物動態学会年会 (2006 年 11 月、東京都)
 21. 辻 淑恵、上井優一、本橋秀之、桂 敏也、乾 賢一：有機アニオントランスポータ hOAT1 及び hOAT3 によるミコフェノール酸及びそのグルクロン酸抱合体の輸送に関する研究. 第 21 回日本薬物動態学会年会 (2006 年 11 月、東京都)
 22. 上尾治正、本橋秀之、桂 敏也、乾 賢一：クロライドイオン依存的なヒト有機アニオントランスポータの活性上昇：OAT1 及び OAT3 に対する影響の差異. 第 21 回日本薬物動態学会年会 (2006 年 11 月、東京都)
 23. 西尾直樹、桂 敏也、乾 賢一：甲状腺ホルモンレセプターによる MDR1 遺伝子の発現調節機構. 第 21 回日本薬物動態学会年会 (2006 年 11 月、東京都)
 24. 横尾幸子、米澤 淳、増田智先、桂 敏也、乾 賢一：4 種の白金系抗癌剤の腎蓄積量とそれに起因する腎障害発症の相違. 第 21 回日本薬物動態学会年会 (2006 年 11 月、東京都)
 25. 西原久美子、紀 琳、増田智先、桂 敏也、乾 賢一：5/6 腎摘出雌性ラットにおける尿細管トランスポータの機能的・分子的変動. 第 21 回日本薬物動態学会年会 (2006 年 11 月、東京都)
 26. Tsuda, M., Terada, T., Irie, M., Katsura, T. and Inui, K.: Computational simulation of Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3). 細胞・生体機能シミュレーションプロジェクト京都大学拠点第 3 回国際シンポジウム (2006 年 12 月、京都市)
 27. 寺田智祐、乾 賢一：薬物輸送と SLC トランスポーター. (シンポジウム) 第 1 回トランスポーター研究会 (2006 年 12 月、東京都)
 28. 小笠原健、寺田智祐、朝賀純一、桂 敏也、乾 賢一：ヒト有機アニオントランスポーター-OAT3 遺伝子における CREB-1、ATF-1 の役割. 第 1 回トランスポーター研究会 (2006 年 12 月、東京都)
 29. 津田真弘、寺田智祐、朝賀純一、上羽美貴、桂 敏也、乾 賢一：膜小胞系を用いた H⁺/有機カチオンアンチポータ MATE1 の駆動力の同定. 第 1 回トランスポーター研究会 (2006 年 12 月、東京都)
 30. Terada, T. and Inui, K.: Pharmacokinetic and pathophysiological roles of intestinal H⁺/peptide cotransporter (PEPT1). 7th Colloquium for the Study of Gastrointestinal Defense System (January 2007, Osaka)
 31. 本橋秀之、桂 敏也、乾 賢一：腎有機カチ

オントランスポータの変動と N¹-メチルニコチンアミド腎排泄との相関. 特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」第一回若手ワークショップ (2007年1月、静岡市)

32. Asaka, J., Terada, T., Tsuda, M., Katsura, T. and Inui, K.: Identification of essential cysteine and histidine residues of H⁺/organic antiporters, MATEs. AAPS workshop on drug transporters in ADME: From bench to the bedside (March 2007, North Bethesda, USA)
33. 寺田智祐: ペプチドトランスポートの機能と発現制御に関する研究. (平成19年度日本薬学会奨励賞受賞講演) 日本薬学会第126年会 (2007年3月、富山市)
34. 寺田智祐、乾 賢一: 小腸および腎薬物トランスポートの転写制御機構. (シンポジウム) 日本薬学会第127年会 (2007年3月、富山市)
35. 朝賀純一、寺田智祐、津田真弘、桂 敏也、乾 賢一: H⁺/有機カチオンアンチポータ MATE の必須 cysteine 残基の同定. 日本薬学会第127年会 (2007年3月、富山市)
36. 上尾治正、本橋秀之、桂 敏也、乾 賢一: Cl⁻依存的なヒト有機アニオントランスポートの活性上昇: hOAT1 及び hOAT3 に対する影響の違い. 日本薬学会第127年会 (2007年3月、富山市)
37. 谷原悠子、増田智先、佐藤朋子、寺田智祐、桂 敏也、乾 賢一: ヒト H⁺/有機カチオンアンチポータ hMATE1 及び hMATE2-K の構造・機能の比較解析. 日本薬学会第127年会 (2007年3月、富山市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

肝臓がんに対する摘除術の施行と肝薬物トランスポータの
発現・遺伝子多型解析

分担研究者 山岡 義生 田附興風会医学研究所 北野病院・病院長

【研究要旨】

肝臓の血管側膜及び胆管側膜には、種々薬物トランスポータが発現し、薬物の肝取り込みや、代謝物あるいはその抱合体の胆汁分泌を媒介している。血管側膜には主に SLC トランスポータである、有機イオントランスポータファミリー（OCT/OCTN/OAT）や organic anion transporting polypeptide (OATP) ファミリーが、また胆管側膜には ABC トランスポータや SLC トランスポータファミリーに属し、最近分子実体が明らかになった H⁺/有機カチオンアンチポータ（MATE1）が発現している。今年度は、手術により摘出した肝臓のサンプル（N=30）を用いて、22 種類の薬物トランスポータの発現量解析、並びに発現量の多かった SLC トランスポータの rSNP 解析を行った。さらに肝臓で高発現を示した OCT1 の転写制御機構について検討を加えた。発現量解析の結果、SLC トランスポータでは、OCT1 > OAT2 > OATP1B1 > MATE1 の順に発現していた。一方、MDR1 や MRP2 など ABC トランスポータの発現は、これら SLC トランスポータに比べて少なかった。OCT1、OAT2、OATP1B1、MATE1 について、転写開始部位上流 1 kb の rSNP の探索を行ったところ、新規 4 種の rSNP を含む 6 種類の rSNP を同定した。特に MATE1 の発現を制御している Sp1 の結合部位の rSNP が注目される。OCT1 のプロモーター解析を行い、USF1 が E-box を介して OCT1 の発現を制御していることが判明した。これらの成果は、肝薬物トランスポータの発現・遺伝子多型プロファイルを初めて明らかにしたものであり、今後の臨床薬物動態解析などの臨床研究において、有用な基盤になりうると考えられる。

A. 研究目的

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

近位尿細管で H⁺/有機カチオンアンチポータとして機能している MATE1 もまた、肝臓の胆管側膜に局在していることが明らかにされ、肝薬物動態を規定するトランスポータの分子実体はほぼ明らかになったと考えられる。これまで、*in vitro* 発現系や動物実験を用いた解析より、これらトランスポータの輸送特性や薬物動態学的役割が明らかになりつつあるが、ヒト正常肝における発現プロファイル、発現制御機構、並びに発現量の個体差に関連する SNP の情報は乏しい。

今年度は、肝細胞がん（HCC）などと診断され、切除された肝臓の腫瘍部及び非腫瘍部を用いて、SLC トランスポータ並びに ABC トランスポータ併せて 22 種類の薬物トランスポータの発現プロファ

イルを精査した。また SLC トランスポータのうち、発現量の大きかった OCT1、OAT2、OATP1B1、さらに MATE1 について、プロモーター部位上流約 1 kb について regulatory SNP (rSNP) 解析を行うと共に、肝臓で発現量の最も大きかった OCT1 の基礎発現における転写機構について検討を加えた。

B. 研究方法

1) 肝薬物トランスポータの発現量解析

肝摘出術を施行された肝がん患者の非腫瘍部及び腫瘍部より、total RNA を精製し、リアルタイム PCR 法によって組織中の薬物トランスポータ発現量を定量した。測定した薬物トランスポータは SLC トランスポータ (14 種類) 並びに ABC トランスポータ (8 種類) である。サンプル間の cDNA 量のばらつきは、GAPDH の発現量を用いて補正した。

2) 肝薬物トランスポータの rSNP 解析

1) で摘出された肝組織からゲノム DNA を調製した。肝臓において高発現を示した OCT1、OAT2、OATP1B1、MATE1 のプロモーター部位 (約 1 kb、ただし MATE1 は 0.5 kb) を PCR 法により増幅し、ダイレクトシーケンス法により rSNP を探索した。

3) OCT1 のプロモーター解析

前年度に構築した、OCT1 のレポーターコンストラクトを、培養肝細胞 HepG2 に一過性に発現させ、レポーターアッセイによりプロモーター活性を測定した。また、DNA プローブと USF1 リコンビナントタンパクの結合をゲルシフトアッセイにより調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヘルシンキ宣言 (1975 年、東京総会で修正) を尊重し計画されたものであり、対象患者個人のプライバシーをはじめとする人権擁護を優先する。すなわち、1) 自由意思による同意が得られた場合にのみ実施対象とすること、2) 同意した場合でも随時撤回でき、それによる不利益を受けることはないこと、3) 血液や組織由来の核酸が他の目的に使用されないこと、4) 遺伝子解析結果を含むすべての検査結果については守秘義務を守ること、5) 研究成果の発表に際しては個人が特定できない方法でのみ行うこと、6) 実施対象者の個人識別情報は連結可能匿名化方式で厳重に管理・保護されること、を遵守する。本研究では、薬物トランスポータ遺伝子の解析結果と薬物動態・薬物毒性の解析結果との比較解析

を行うため、連結可能匿名化方式での管理・保護が必要と考えられる。摘出組織試料は、本研究のために採取するものではなく、肝臓がんの外科的治療により摘出した組織の一部を使用するものである。遺伝カウンセリングは原則として行わないが、対象患者個人の「知る権利」及び「知らないでいる権利」を保護するため、患者自身の要望に応じ実施することとする。なお、本研究計画の実施にあたり、「ヒト組織を用いた薬剤性臓器障害発現機序の解明と薬剤毒性発現スクリーニング法の開発に関する研究」(承認日:平成 14 年 8 月 20 日、追加承認日:平成 16 年 3 月 15 日、追加承認日:平成 18 年 9 月 21 日)、「薬物の体内動態・薬効の個人差予測に関する臨床研究」(承認日:平成 16 年 1 月 19 日、追加承認日:平成 17 年 5 月 26 日、追加承認日:平成 18 年 1 月 11 日)が、京都大学医学部・医の倫理委員会において厳正に審議され承認されている。なお、上記ヒトを対象とした遺伝子解析研究計画並びに審査・承認過程は、平成 13 年 4 月 1 日に施行された文部科学省・厚生労働省・経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守するものである。

C. 研究成果

1) 肝薬物トランスポータの発現プロファイル

30 名の肝臓がん患者から得られた非腫瘍部及び腫瘍部の肝 RNA を用いて、22 種類の主要な薬物トランスポータの発現量を定量した (Fig.1)。SLC トランスポータファミリーでは、非腫瘍部、腫瘍部ともに、OCT1、OAT2 が高発現しており、OATP1B1、MATE1 もそれらに次ぐ高い発現を示した。一方、ABC トランスポータファミリーでは OCT1 や OAT2 の発現量に比べると低いものの、MDR1、MRP2、MRP3、MRP6 の発現が認められた。また、ABC トランスポータファミリーでは、非腫瘍部に比べ、腫瘍部で発現量が上昇している傾向が認められた。

今回発現解析を行った 30 名を、B 型肝炎ウイルス (HBV) 及び C 型肝炎ウイルス (HCV) 陰性群、HBV 陽性群、HCV 陽性群に群分けし、薬物トランスポータの発現量の比較解析を行ったが、群間で発現量に有意な差異が認められた薬物トランスポータは存在しなかった。

2) 肝薬物トランスポータの rSNP 解析

プロモーター部位は mRNA の発現を制御しており、その部位における変異 (rSNP) が mRNA の

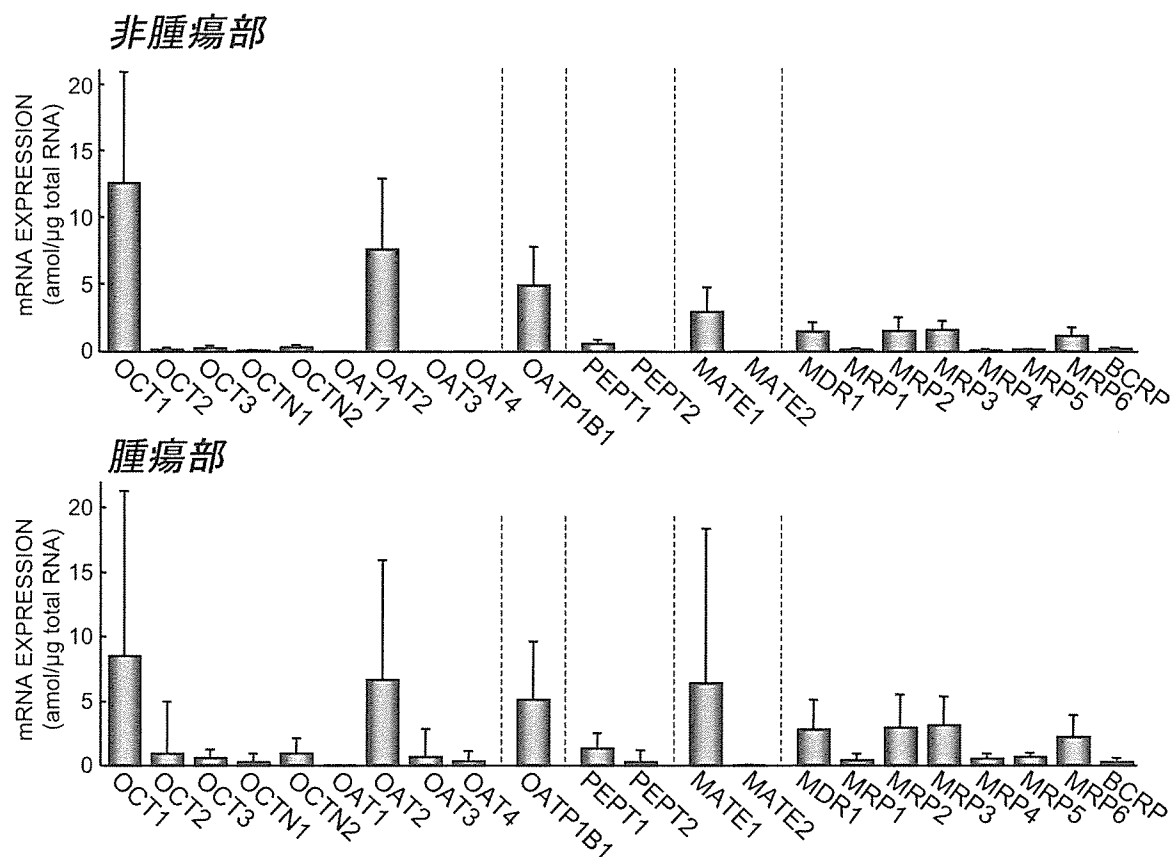


Fig. 1. 肝臓（腫瘍部及び非腫瘍部）における種々薬物トランスポートの発現プロファイル（N=30）

Table 1. 非腫瘍部における OCT1、OATP1B1 及び MATE1 の rSNP (*は NCBI で未報告の rSNP)

Transporter	Position	Reference SNP ID	Allele	Allele Frequency (NCBI) (%)	Allele Frequency (%)	Genotype (%)	Number
OCT1	*-1,083	-	A	-	98.3	A/A	29
			G	-	1.7	G/A	1
						G/G	0
OATP1B1	-814	rs4149015	G	-	90.0	G/G	24
			A	-	10.0	A/G	6
						A/A	0
	*-616	-	G	-	95.0	G/G	27
			A	-	5.0	A/G	3
						A/A	0
-317	rs11835045	T	99.0	91.7	T/T	25	
		C	1.0	8.3	C/T	5	
					C/C	0	
MATE1	*-65	-	C	-	98.3	C/C	29
			A	-	1.7	A/C	1
						A/A	0
	*32	-	G	-	98.3	G/G	29
			A	-	1.7	A/G	1
					A/A	0	

発現量を変化させることが知られている。そこで、発現解析で肝臓において発現の多かった OCT1、OAT2、OATP1B1、MATE1 について、rSNP の探索を行った (Table 1)。解析領域は転写開始部位より上流約 1 kb とした (ただし、MATE1 は 0.5 kb)。

2-1) OCT1

OCT1 では、今までに報告されていない-1083 位の A が G に置換する変異が見つかり、アレル頻度は 1.7%であった。

2-2) OAT2

今回検索した OAT2 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) OATP1B1

OATP1B1 では、三つの変異が見つかった。それらは、-814 位の G が A に置換する変異 (アレル頻度 10%)、-616 位 G が A に置換する変異 (アレル頻度 5%)、-317 位の T が C に置換する変異 (アレル頻度 8.3%) であり、このうち-616 位の変異は今までに報告されていない変異であった。また、-616 位の変異をヘテロでもつ患者は-317 位の変異をヘテロでもつ傾向があり、両者はハプロタイプを形成していることが示唆された。

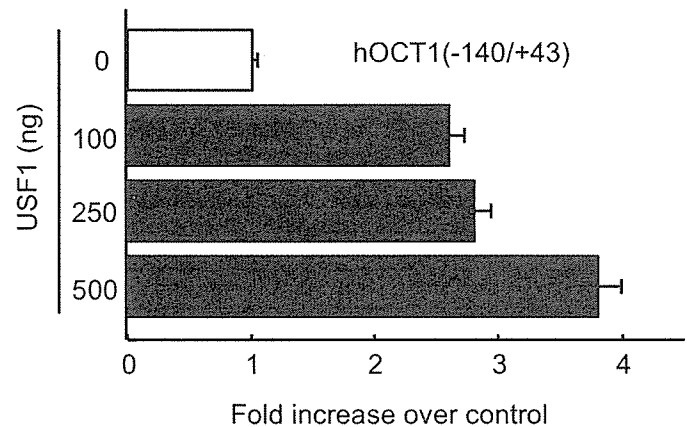
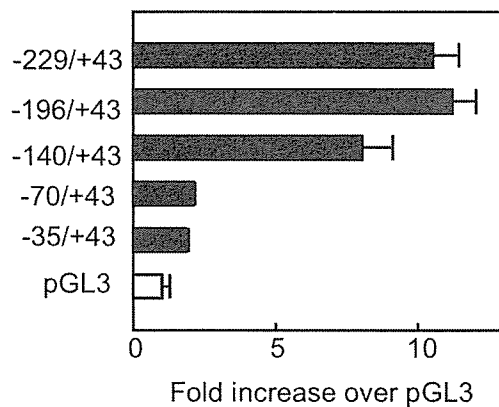
2-4) MATE1

MATE1 では、二つの変異が見つかった。それらは、-65 位の C が A に置換する変異(アレル頻度

1.7%) および -32 位の G が A に置換する変異(アレル頻度 1.7%) であり、ともに今までに報告されていない変異であった。

3) OCT1 のプロモーター解析

SLC トランスポーターファミリーの中で、肝臓で発現量の多かった OCT1 のプロモーター解析を行った。5'RACE 法によりヒト OCT1 の転写開始部位が翻訳開始部位より 105 bp 上流に存在することが判明した。転写開始部位より上流約 2,500 bp のプロモーター領域を含むレポーターコンストラクトを作製し、HepG2 細胞を用いてレポーターアッセイを行った。その結果、転写開始部位より上流-140~-70bp 付近に基礎発現に重要なシスエレメントが存在する可能性が示唆された (Fig. 2)。この領域には USF1 などの転写因子が結合し、基礎転写に関与することが報告されている E-box の塩基配列が完全に保存されていた。そこで、USF1 の関与を機能的に確認するため、E-box に変異を導入しレポーター活性を測定したところ、プロモーター活性は完全に消失した。さらに OCT1 のプロモーター活性は、USF1 を過剰発現させることによって投与量依存的に促進された (Fig. 2)。また、USF1 リコンビナントタンパクと E-box を含む領域のオリゴ DNA を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、USF1 が E-box に結合していることが判明した。以上のことから、OCT1 の基礎転写には、E-box を介した USF1 による制御が関与していることが明らかになった。



-100 ATGGCC**CACGTG**CATTCTTCCTTTTCCTGAAA -70
E Box
 (USF1 binding site)

Fig. 2. OCT1 のプロモーター解析。基礎発現には USF1 が関与している。

D. 考察

肝臓における SLC 並びに ABC トランスポータ (合計 22 種類) の発現解析を行ったところ、SLC トランスポータでは OCT1 > OAT2 > OATP1B1 > MATE1 の順に発現していた。いずれもカチオン性あるいはアニオン性薬物の肝動態に重要な役割を果たしていることが示されており、発現量の多さはこのような機能的な重要性を強く支持するものである。また小腸での薬物吸収に関与しているペプチドトランスポータ (PEPT1) も、肝臓に発現していることが判明し、局在や生理・薬物動態学的役割の解明が期待される。一方、ABC トランスポータファミリーでは、MDR1 や MRP2 など薬物動態学的役割が明らかになっているトランスポータでさえ、OCT1 の 1~10% と低い発現量を示し、この傾向は消化管や腎臓においても同様であった。ABC トランスポータは ATP の加水分解を駆動力とする一次性能動輸送であり、強力な輸送能を発揮すると考えられることから発現量は少なくとも十分であることが推察される。

SLC トランスポータのうち発現量の多かった OCT1、OAT2、OATP1B1、MATE1 について、rSNP 解析を実施した。OAT2 では rSNP は検出されなかったが、その他のトランスポータでは、新規のものを含め数種の rSNP が見つかった。これらの rSNP と発現量との関連については、変異を有する患者数が少ないため統計的な解析を実施することが不可能であった。今後症例を追加して、解析を行う必要がある。特に、MATE1 の -32 位の変異 (G-32A) については、MATE1 の基礎発現を制御している Sp1 結合部位に相当し、SNP により Sp1 結合の低下並びにプロモーター活性の低下が明らかにされており (分担研究者小川の項参照)、注目に値する rSNP と考えられる。

肝臓に発現する OCT1 のプロモーター解析を行ったところ、USF1 が E-box を介して基礎発現を制御していることが示された。USF1 の cSNP が、家族性高脂血症やインスリン感受性に関与していることが報告されており、USF1 の機能変化を伴う cSNP が間接的に OCT1 の発現量に影響を与えている可能性が考えられる。また、主任研究者乾によって、腎臓特異的に発現する OCT2 もまた、USF1 によって制御されていることが明らかにされている。OCT1 の発現は肝特異的であることから、同じ USF1 によって転写が制御される OCT1 と OCT2 が、どのようなメカニズムで臓器特異性が決定されているのか興味深い点である。最近シマリスの HP-27 遺伝子の USF 結合

領域のメチル化が、臓器特異性を規定しているとの報告がなされている。OCT においても E-box のメチル化の程度が臓器特異性を決定していることが考えられると同時に、このようなエピジェネティックな修飾が薬物トランスポータ発現量の個体差に関与している可能性も考えられる。今後は発現量の規定因子の一つとして、メチル化にも焦点を当てて検討を進めていく予定である。

E. 結論

肝臓では SLC トランスポータのうち、OCT1、OAT2、OATP1B1、MATE1 が高発現していた。一方、MDR1 や MRP2 など ABC トランスポータの発現量は、SLC トランスポータに比べて少なかった。上記 4 種類の薬物トランスポータの rSNP 解析を実施し、新規の SNP を含む 6 種類の rSNP を同定した。特に、MATE1 プロモーターの Sp1 結合部位の rSNP (G-32A) が発現量に影響を及ぼす可能性が高いと考えられる。また、OCT1 の基礎発現には、USF1 が関与していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

得られた成果の中に健康被害情報に該当するものはない。

G. 研究成果発表

1. 論文発表

1. Kume, M., Banafsche, R., Yamamoto, Y., Yamaoka, Y., Nobiling, R., Gebhard, M.M. and Klar, E.: Dynamic changes of post-ischemic hepatic microcirculation improved by a pre-treatment of phosphodiesterase-3 inhibitor, milrinone. *J. Surg. Res.* **136**(2), 209-218 (2006)
2. Ikai, I., Takayasu, K., Omata, M., Okita, K., Nakanuma, Y., Matsuyama, Y., Makuuchi, M., Kojiro, M., Ichida, T., Arii, S. and Yamaoka, Y.; Liver Cancer Study Group of Japan.: A modified Japan Integrated Stage score for prognostic assessment in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.*, **41**(9), 884-892 (2006)
3. Takayasu, K., Arii, S., Ikai, I., Omata, M., Okita, K., Ichida, T., Matsuyama, Y., Nakanuma, Y., Kojiro, M., Makuuchi, M. and Yamaoka, Y.; Liver Cancer Study Group of Japan.: Prospective cohort study of transarterial chemoembolization

for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. *Gastroenterology*, **131**(2), 461-469 (2006)

4. Nishimura, T., Nishida, N., Komeda, T., Fukuda, Y., Ikai, I., Yamaoka, Y. and Nakao, K.: Genome-wide semiquantitative microsatellite analysis of human hepatocellular carcinoma: discrete mapping of smallest region of overlap of recurrent chromosomal gains and losses. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **167**(1), 57-65 (2006)

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし