

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

腎臓がんに対する摘除術の施行と ゲノム情報と臨床データの相関解析

分担研究者

小川 修 京都大学医学部附属病院泌尿器科学教授

【研究要旨】

腎臓の近位尿細管上皮細胞の側底膜並びに刷子縁膜には、様々な薬物トランスポータが発現し、薬物や代謝産物の効率的な尿細管分泌を媒介している。近年、これら腎薬物トランスポータ発現量の個体差が、薬物腎排泄の個体差に密接に関わっていることが明らかにされてきたが、発現量の個体差を規定する因子については未だ不明である。昨年度は主に腎臓に発現する有機イオントランスポータ（OCT2、OAT1、OAT3、OAT4）に焦点を当て、各トランスポータのプロモーター領域の遺伝子多型（rSNP）を解析し、発現量との相関について調べた。本年度は、長年分子実体の不明であった腎刷子縁膜側に発現する H⁺/有機カチオンアンチポータ（MATE1 及び MATE2-K）の cDNA を単離し、その機能、発現、プロモーター解析、並びに rSNP の探索を行い、本トランスポータの個別化薬物療法への応用のための基礎情報を収集した。MATE1 や MATE2-K は 12 回膜貫通型の構造を示し、いずれも腎臓の近位尿細管上皮細胞の刷子縁膜に局在していた。両トランスポータの安定発現細胞を構築し、基質認識特性を調べたところ、経口糖尿病治療薬メトホルミンや抗胃潰瘍薬シメチジンなどを輸送した。MATE1 の基礎転写には Sp1 が重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、Sp1 結合部位の rSNP を同定し、プロモーター活性や MATE1 の発現を低下させることを見出した。これらの研究成果は、腎薬物トランスポータ発現量の個体差を解明する上で有用な基礎的知見になると考えられる。

A. 研究目的

腎臓は肝臓と共に、生体異物の解毒機構として重要な役割を果たしている。なかでも、近位尿細管に発現する有機イオントランスポータは、カチオンあるいはアニオンに荷電した、薬物や代謝産物の尿細管分泌を媒介し、生体防御システムの一つとして重要な役割を担っている。これまで、主に側底膜に発現する有機カチオントランスポータ（OCT）や有機アニオントランスポータ（OAT）の構造、機能、発現に関する *in vitro* 研究と、それらの分子情報を基盤とした臨床研究が進展してきた。一方、刷子縁膜側に発現するトランスポータの分子実体については長年不明であり、ゲノム情報などを用いた臨床研究を実施することは不可能であった。2005 年に岡山大学の森山らのグループによって、大腸菌の多剤耐性に

関与する Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) のほ乳類ホモログとして、ヒト腎より MATE1 が単離された。そこで我々も、ヒト腎より MATE1 並びにそのアイソフォームである MATE2-K の cDNA を単離し、薬物輸送特性、ヒト腎における発現量、さらにはプロモーター解析を実施し、今後の臨床研究を実施するための基礎データの収集を試みた。

B. 研究方法

1) hMATE1 及び hMATE2-K の cDNA クローニング

hMATE1 (AK001709) 及び hMATE2 (NM_152908) の遺伝子情報をもとに設計したプライマーを用いて、PCR 法により各遺伝子を単離した。得られた産物は発現ベクター pcDNA3.1 (+) にサブクローニングし、

塩基配列を確認した。各遺伝子の臓器分布並びに患者個々の mRNA 発現量は、リアルタイム PCR 法により検討した。また、スプライシングバリエーションの検出は PCR 法により行った。さらに両トランスポータに対する特異的抗体を作成し、腎臓における膜局在を免疫蛍光法により観察した。

2) hMATE1 及び hMATE2-K を介した薬物輸送解析

各遺伝子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、種々の放射性標識化合物を含むメEDIUM 中でインキュベーションし、細胞内蓄積量を液体シンチレーション法により測定した。

3) hMATE1 のプロモーター解析と rSNP 解析

hMATE1 のプロモーター領域として、転写開始部位から上流約 2.5 kb を human genomic DNA を鋳型として PCR 法により増幅し、pGL3-Basic ベクターにサブクローニングした。デリーションコンストラクトは PCR 法や制限酵素を用いて、また変異体は、市販キットを用いて作製した。これらのコンストラクトを、H⁺/有機カチオンアンチポータの発現していることが知られている培養腎上皮細胞 LLC-PK₁ 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 Sp1 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。

また腎不全患者 90 名分のゲノム DNA を精製し、MATE1 のプロモーター部位を PCR により増幅しダイレクトシーケンスを行うことによって、遺伝子多型解析を行った。また同定された rSNP を含むレポーターコンストラクトを作製し、レポーターアッセイによってその転写活性に及ぼす影響について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヘルシンキ宣言 (1975 年、東京総会で修正) を尊重し計画されたものであり、対象患者個人のプライバシーをはじめとする人権擁護を優先する。すなわち、1) 自由意思による同意が得られた場合にのみ実施対象とすること、2) 同意した場合でも随時撤回でき、それによる不利益を受けることはないこと、3) 血液や組織由来の核酸が他の目的に使用されないこと、4) 遺伝子解析結果を含むすべての検査結果については守秘義務を守ること、5) 研究成果

の発表に際しては個人が特定できない方法でのみ行うこと、6) 実施対象者の個人識別情報は連結可能匿名化方式で厳重に管理・保護されること、を遵守する。本研究では、薬物トランスポータ遺伝子の解析結果と薬物動態・薬物毒性の解析結果との比較解析を行うため、連結可能匿名化方式での管理・保護が必要と考えられる。摘出組織試料は、本研究のために採取するものではなく、腎臓がん等の外科的治療により摘出した組織の一部を使用するものである。遺伝カウンセリングは原則として行わないが、対象患者個人の「知る権利」及び「知らないでいる権利」を保護するため、患者自身の要望に応じ実施することとする。なお、本研究計画の実施にあたり、「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) hMATE1 並びに hMATE2-K の構造、臓器分布、膜局在

単離した hMATE1 cDNA の塩基配列は、既報の配列と一致した。他方、hMATE2 に対するプライマーを用い hMATE2 遺伝子の増幅を試みたところ、新たにそのスプライシングバリエーションである hMATE2-K と hMATE2-B の同定に至った。hMATE2-K は hMATE2 のエクソン 7 における 108 bp 欠損体であり、566 アミノ酸のタンパクをコードし、hMATE1 とのアミノ酸相同性は 52% であった。hMATE2-B 遺伝子では、hMATE2 遺伝子に塩基が 46 bp 挿入されることによってフレームシフトが起こり、220 アミノ酸と短いタンパクをコードすることが判明した。組織分布を検討したところ、hMATE1 は腎臓、副腎、肝臓、筋肉などに発現することがわかった (Fig. 1)。一方、hMATE2-K および hMATE2-B の発現は腎特異的であり、さらに PCR 法により hMATE2-K 優位な

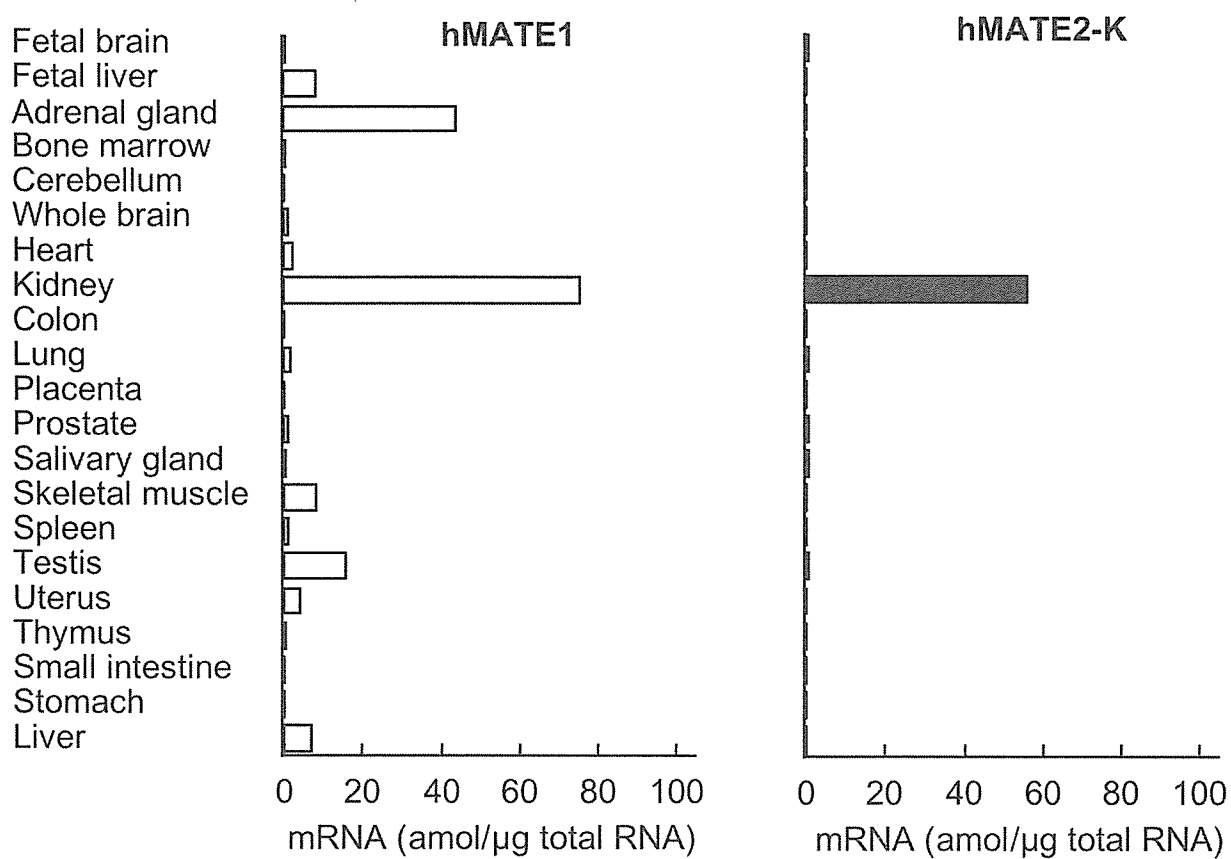


Fig. 1. hMATE1 並びに hMATE2-K の mRNA 発現分布

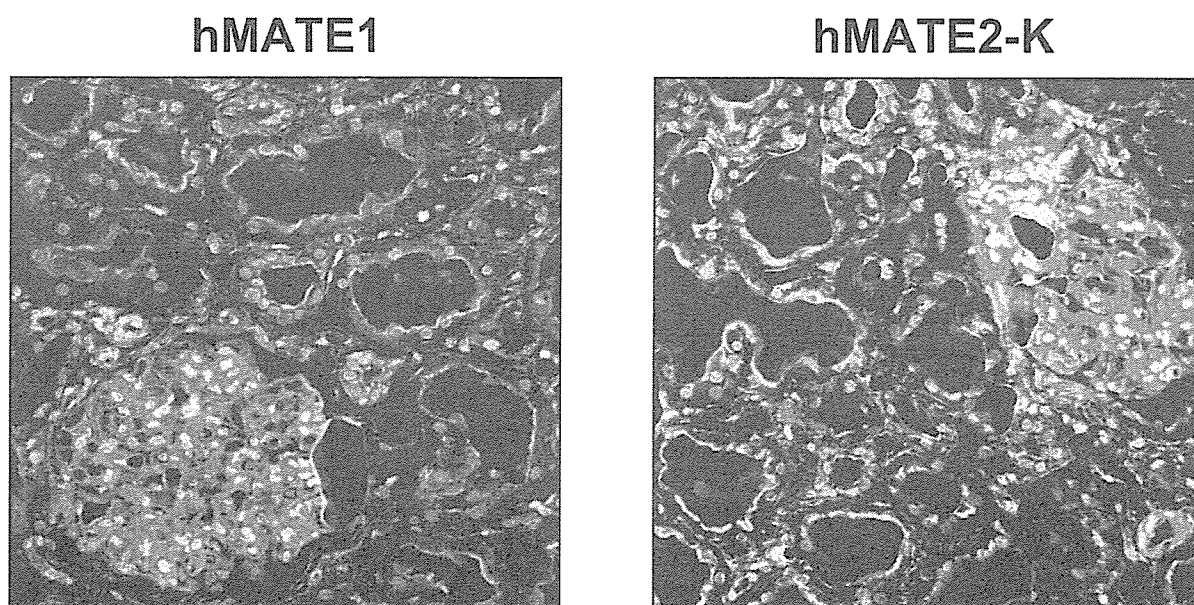


Fig. 2. hMATE1 並びに hMATE2-K の腎内分布と膜局在

発現が認められた (Fig. 1)。これまでに報告されている hMATE2 (PNAS, 102, 17923-17928, 2005) の mRNA は検出されなかった。特異抗体を用いた免疫組織化学的解析により、hMATE1 および hMATE2-K は、側底膜側の有機カチオントランスポータ hOCT2 と同様の腎内局在すなわち腎皮質の近位尿細管に発現することが判明し、刷子縁膜への局在が明示された (Fig. 2)。また、hOCT1-3 並びに hMATE1、hMATE2-K の mRNA 発現量を腎腫瘍患者の正常腎組織 (N=82) を用いて測定したところ、MATE1 や MATE2-K の発現は OCT2 の発現よりは低いことがわかった。

2) hMATE1 並びに hMATE2-K の薬物輸送特性

hMATE1 もしくは hMATE2-K 発現細胞において H⁺/有機カチオンアンチポータの典型的基質であるテトラエチルアンモニウム (TEA) の輸送が認められた。スプライシングバリエーションである hMATE2-B による TEA 取り込み活性は観察されなかった。次に pH 依存性について検討を加えた。細胞外アルカリ化もしくは細胞内酸性化により作成した逆向きの H⁺勾配によって、両トランスポータを介した TEA 輸送は促進された。さらに両トランスポータの薬物認識特性について検討した結果、尿細管分泌を受けることが報告されているカチオン性薬物である経口糖尿病治療薬メトホルミン、抗胃潰瘍薬シ

メチジン、抗不整脈薬プロカインアミドの細胞内取り込みは、hMATE1 および hMATE2-K 発現により増大した。また両性イオン型抗生物質であるセファレキシンは hMATE1 によって輸送されたが、hMATE2-K による輸送は認められなかった。

3) hMATE1 のプロモーター解析と rSNP 解析

hMATE1 の基礎転写に重要な部位を調べるために、デリションコンストラクトを用いて検討した。その結果、転写開始部位より上流 70 bp 付近を欠損させると著しい転写活性の減少が認められた。この領域を転写因子結合データベースで検索したところ、2つの Sp1 推定結合領域 (GC box) が存在した。Sp1 結合阻害薬であるミトラマイシン A によってプロモーター活性が減少し、Sp1 を過剰発現させるとプロモーター活性の増大が認められた。2つの Sp1 推定結合領域にそれぞれ変異を導入したところ、どちらの変異体においてもプロモーター活性の減少が確認された。さらに、ゲルシフトアッセイにより GC box に Sp1 の結合することが明らかとなった。従って、hMATE1 の基礎転写には Sp1 が重要な役割を果たしていることが示された。

hMATE1 の rSNP 解析を行ったところ、-32 位の G が A に置換する変異が見つかった。この rSNP は今までに報告されていない変異であり、アレル頻度は 3.4%であった。この rSNP の基礎転写に及ぼす影響

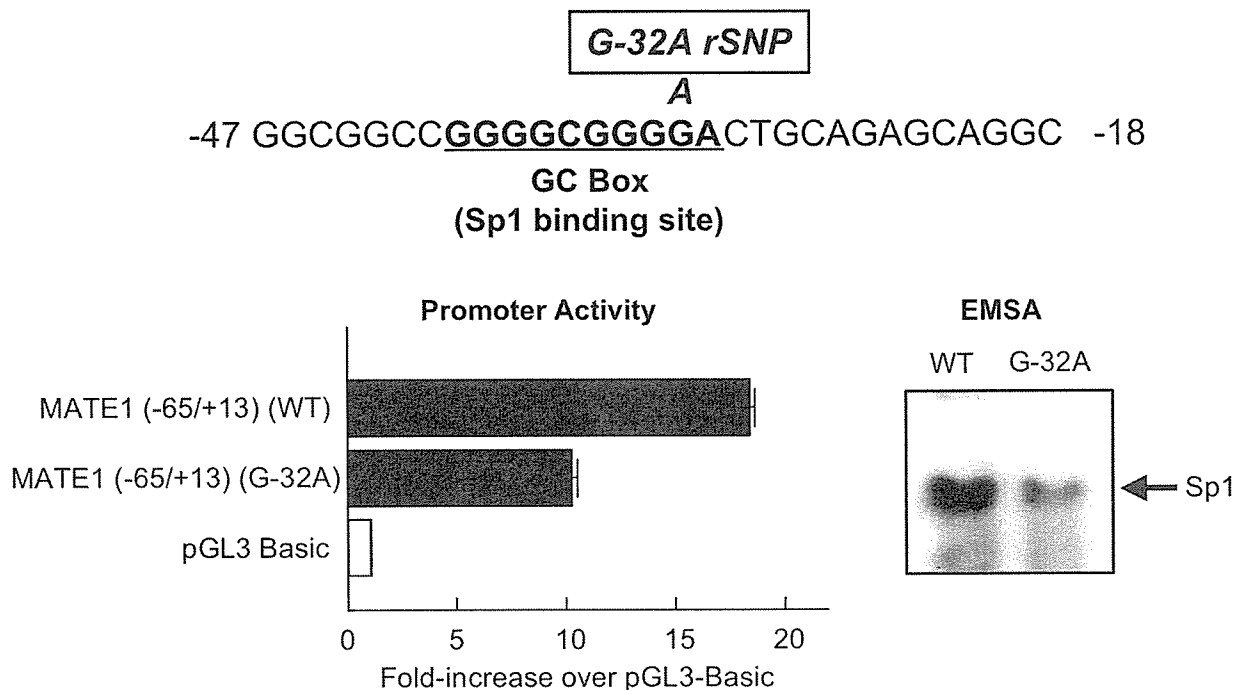


Fig. 3. hMATE1 プロモーターにおける Sp1 結合部位の rSNP

を調べたところ、wild type (WT)に比べて顕著に活性が減少した (Fig. 3)。また Sp1 の結合性についてゲルシフトアッセイによって検討した結果、SNP を有するオリゴ DNA では Sp1 の結合性が低下することがわかった (Fig. 3)。従って、hMATE1 の rSNP (G-32A)によって、hMATE1 の発現量が低下し、hMATE1 によって輸送される薬物の腎動態に影響を及ぼすことが示唆された。

D. 考察

薬物尿細管分泌は側底膜における取り込みと刷子縁膜における分泌の協調機構である。これまでの研究から、有機カチオントランスポータ hOCT2 がカチオン性薬物の側底膜側における取り込みを規定する分子として知られているが、刷子縁膜側の分泌を媒介する H⁺/有機カチオンアンチポータの分子実体は不明であった。2005 年に森山らのグループによって同定された hMATE1 に加え、さらに我々は腎特異的な hMATE2-K の単離に成功した。hMATE1 および hMATE2-K は、膜局在性及び輸送機能特性から刷子縁膜側におけるカチオン性薬物の尿細管分泌を媒介する H⁺/有機カチオンアンチポータであることが強く示唆された。

hMATE1 および hMATE2-K の輸送機能解析から、尿細管分泌を受ける主要なカチオン性薬物であるメトホルミン、シメチジン、プロカインアミドが MATEs の基質となることが示された。MATEs の基質認識特性および腎臓における発現分布は側底膜側 hOCT2 と類似しており、hOCT2 を介して取り込まれた薬物は hMATE1 および hMATE2-K を介して尿細管管腔へ分泌されると考えられる。したがって、hOCT2 および hMATE1 と hMATE2-K はカチオン性薬物の尿細管分泌能を規定する重要な分子となることが示唆される。今後、極性を有する上皮細胞に hOCT2 と hMATE1 あるいは hMATE2-K を共発現させ、*in vitro* で両トランスポータの機能的連関を評価できる系の確立が望まれる。

さらに、hMATE1 は両性イオン型薬物であるセファレキシンを輸送することが示された。これまでに我々は、セファレキシンが側底膜において有機アニオントランスポータ hOAT3 に輸送されることを明らかにしている。したがって、hMATE1 はカチオン性薬物だけでなく hOAT3 と協調した両性イオン型薬物の尿細管分泌も媒介することが示唆された。

hMATE1 の転写制御機構として、近位プロモーター領域に存在する 2 つの GC box に Sp1 が結合し、

基礎発現を調節していることが判明した。また、このうち下流の GC box には-32 位の G が A に置換する rSNP が存在することが判明し、プロモーター活性に影響を及ぼすことが明らかになった。I 型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) のイントロン 1 内に転写因子 Sp1 の結合部位が存在するが、この部位の G が T に変異する SNP が、閉経後のイギリス人で骨密度と相関することが報告されている (Nature Genet., 14, 203-205, 1996)。また、アディポサイトカインの一つであるレジスチン遺伝子の C-420G の rSNP では、Sp1 の結合が増えることによってレジスチンの発現が増加し、2 型糖尿病の発症に関与していることが報告されている (Am. J. Hum. Genet., 75, 678-686, 2004)。このように、Sp1 結合部位の SNP が病態と関連しているという報告は散見されるが、薬物動態関連遺伝子の発現に影響を及ぼすという報告はほとんど見当たらない。上述したように、hMATE1 はオキサリプラチン (白金系抗がん剤) やメトホルミン (糖尿病治療薬) など、適正使用が推奨されている医薬品の尿細管分泌に極めて重要な役割を果たしていることから、本知見は臨床研究への発展が期待できる有望な成果であると期待される。

E. 結論

hMATE1 に加え腎特異的な H⁺/有機カチオンアンチポータ hMATE2-K の単離に成功し、カチオン性薬物の排泄の規定分子を同定した。組織分布および輸送機能解析の結果から、側底膜側の hOCT2 とともに hMATE1 および hMATE2-K が協調してカチオン性薬物の尿細管分泌を媒介することが示唆された。さらに、hMATE1 の基礎転写に Sp1 が関与することを示し、加えて hMATE1 の発現量に影響を与えると推定される Sp1 結合部位の rSNP を見出した。腎薬物トランスポータの機能特性および発現調節機構を解明し、薬物体内動態の個体差を分子的に明らかにしていく上で重要な基礎的情報を得ることができた。

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. 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)
2. 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.*, **241**(1), 59-63 (2006)
 3. 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)
 4. 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)
 5. 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*, **25**(17), 2500-2508 (2006)
 6. Tsuchiya, N., Mishina, M., Narita, S., Kumazawa, T., Inoue, T., Horikawa, Y., Kakinuma, H., Yuasa, T., Matsuura, S., Satoh, S., Ogawa, O. and Habuchi, T.: Association of XRCC1 gene polymorphisms with the susceptibility and chromosomal aberration of testicular germ cell tumors. *Int. J. Oncol.*, **28**(5), 1217-1223 (2006)
 7. Tsuchiya, N., Wang, L., Suzuki, H., Segawa, T., Fukuda, H., Narita, S., Shimbo, M., Kamoto, T., Mitsumori, K., Ichikawa, T., Ogawa, O., Nakamura, A. and Habuchi, T.: Impact of IGF-I and CYP19 gene polymorphisms on the survival of patients with metastatic prostate cancer. *J. Clin. Oncol.*, **24**(13), 1982-1989 (2006)
 8. Sato, E., Yano, I., Jiko, M., Takahashi, K., Motohashi, H., Masuda, S., Katsura, T., Nishiyama, H., Segawa, T., Ito, N., Kamoto, T., Ogawa, O. and Inui, K.: Evaluation of Calvert's formula for dosage adjustment of carboplatin in Japanese patients with hormone refractory prostate cancer. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**(7), 1441-1444 (2006)
 9. Inoue, T., Segawa, T., Shiraishi, T., Yamada, T., Kinukawa, N., Yoshida, T., Toda, Y., Shimizu, Y., Nakamura, E., Kinoshita, H., Kamoto, T. and Ogawa, O.: High-grade and hormone-treated prostate cancer express high levels of thymidylate synthase. *BJU Int.*, **98**(1), 197-200 (2006)
 10. 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)
 11. Kawanishi, H., Takahashi, T., Ito, M., Watanabe, J., Higashi, S., Kamoto, T., Habuchi, T., Kadowaki, T., Tsujimoto, G., Nishiyama, H. and Ogawa, O.: High throughput comparative genomic hybridization array analysis of multifocalurothelial cancers. *Cancer Sci.*, **97**(8), 746-752 (2006)
 12. Inoue, T., Yoshida, T., Shimizu, Y., Kobayashi, T., Yamasaki, T., Toda, Y., Segawa, T., Kamoto, T., Nakamura, E. and Ogawa, O.: Requirement of androgen-dependent activation of protein kinase C ζ for androgen-dependent cell proliferation in LNCaP cells and its roles in transition to androgen-independent cells. *Mol. Endocrinol.*, **20**(12), 3053-3069 (2006)
 13. Sugino, Y., Usui, T., Okubo, K., Nagahama, K., Takahashi, T., Okuno, H., Hatayama, H., Ogawa, O., Shimatsu, A. and Nishiyama, H.: Genotyping of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency presenting as male infertility: Case report and literature review. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **23**(9-10), 377-380 (2006)
 14. Kanatani, I., Ikai, T., Okazaki, A., Jo, J.I., Yamamoto, M., Imamura, M., Kanematsu, A., Yamamoto, S., Ito, N., Ogawa, O. and Tabata, Y.: Efficient gene transfer by pullulan-spermine occurs through both clathrin- and raft/caveolae-dependent mechanisms. *J. Control. Release.*, **116**(1), 75-82 (2006)

15. Kobayashi, T., Kawakita, M., Terachi, T., Habuchi, T., Ogawa, O. and Kamoto, T.: Significance of elevated preoperative alpha-fetoprotein in postchemotherapy residual tumor resection for the disseminated germ cell tumors. *J. Surg. Oncol.*, **94**(7), 619-623 (2006)
 16. Matsui, Y., Ueda, S., Watanabe, J., Kuwabara, I., Ogawa, O. and Nishiyama, H.: Sensitizing effect of galectin-7 in urothelial cancer to cisplatin through the accumulation of intracellular reactive oxygen species. *Cancer Res.*, **67**(3), 1212-1220 (2007)
 17. Matsui, S., Ito, M., Nishiyama, H., Uno, H., Kotani, H., Watanabe, J., Guilford, P., Reeve, A., Fukushima, M. and Ogawa, O.: Genomic characterization of multiple clinical phenotypes of cancer using multivariate linear regression models. *Bioinformatics*, in press.
 18. Shang, D., Ito, N., Watanabe, J., Awakura, Y., Nishiyama, H., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Synergy of interferon-alpha and 5-fluorouracil in human renal cell carcinoma requires p53 activity. *Eur. Urol.*, in press.
2. 学会発表
1. 伊藤将彰、西山博之、松井茂之、川西博晃、松井喜之、高橋 毅、賀本敏行、小川 修：P21-activated kinase (Pak) 1 の表在性膀胱癌再発における役割の解析。第 15 回泌尿器科分子・細胞研究会 (2006 年 2 月、京都)
 2. 井上貴博、中村英二郎、吉田 徹、清水洋祐、清川岳彦、賀本敏行、小川 修：P70 S6 Kinase 経路は前立腺癌細胞のアンドロゲン非依存性増殖能獲得に関与する。第 15 回泌尿器科分子・細胞研究会 (2006 年 2 月、京都)
 3. 清水洋祐、清川岳彦、吉田 徹、中村英二郎、井上貴博、小林 恭、賀本敏行、小川 修：新規アンドロゲン依存性前立腺癌 Xenograft は抗アンドロゲン剤ビカルタミドにて増殖刺激を受ける。第 5 回 ステロイドホルモンを考える会 (2006 年 3 月、東京)
 4. Matsui, Y., Watanabe, J., Nishiyama, H., Kawanishi, H., Ito, M., Takahashi, T., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Triptolide (PG490)-mediated sensitization of urothelial cancer cells to cisplatin induced apoptosis. 21nd Annual Congress of European Association of Urology (April 2006, Paris)
 5. Kobayashi, T., Inoue, T., Shimizu, Y., Segawa, T., Kamoto, T., Nakamura, E. and Ogawa, O.: Rheb, a novel small G-protein of Ras superfamily, is associated with proliferation in human prostate cancer cell lines. 21nd Annual Congress of European Association of Urology (April 2006, Paris)
 6. 松井喜之、渡部 淳、西山博之、川西博晃、伊藤将彰、高橋 毅、賀本敏行、小川 修：尿路上皮癌における新規標的分子 Galectin 7 の同定と解析。第 94 回日本泌尿器科学会総会 (2006 年 4 月、福岡)
 7. 川西博晃、中村英二郎、松井喜之、伊藤将彰、山崎俊成、高橋毅、西山博之、賀本敏行、辻本豪三、妙本 陽、秋山英雄、信正 均、小川 修：細胞培養上清のプロテオーム解析による尿路上皮癌増殖因子の同定。第 94 回日本泌尿器科学会総会 (2006 年 4 月、福岡)
 8. 山崎俊成、中村英二郎、川西博晃、粟倉康夫、井上貴博、神波大己、伊藤哲之、賀本敏行、小川 修：VHL 遺伝子変異に伴うシグナル伝達経路の活性化と腎細胞癌増殖への関与。第 94 回日本泌尿器科学会総会 (2006 年 4 月、福岡)
 9. 粟倉康夫、高橋毅、中村英二郎、伊藤哲之、賀本敏行、小川 修、小谷泰一、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マーカーの探索。第 94 回日本泌尿器科学会総会 (2006 年 4 月、福岡)
 10. 清水洋祐、清川岳彦、中村英二郎、井上貴博、吉田徹、賀本敏行、白石泰三、小川 修：ヒト前立腺癌における Akt 及び活性型 Akt 発現の予後因子としての解析。第 94 回日本泌尿器科学会総会 (2006 年 4 月、福岡)
 11. 小林 恭、中村英二郎、井上貴博、清水洋祐、清川岳彦、賀本敏行、小川 修：ヒト前立腺癌細胞株における S6K 経路上流シグナル伝達分子の解析。第 94 回日本泌尿器科学会総会 (2006 年 4 月、福岡)
 12. Matsui, Y., Kawanishi, H., Ito, M., Watanabe, J., Nishiyama, H., Ogawa, O., Ueda, S., Kuwabara, I. and Liu, FT.: Impact of galectin 7 expression on

- the chemosensitivity of urothelial cancer. The American Urological Association (AUA)'s 2006 Annual Meeting (May 2006, Atlanta)
13. 川西博晃、中村英二郎、松井喜之、伊藤将彰、山崎俊成、高橋 毅、西山博之、賀本敏行、妙本 陽、秋山英雄、信正 均、小川 修：細胞培養上清蛋白ショットガンプロテオミクスによる膀胱癌浸潤関連因子の同定. 第2回日本臨床プロテオーム研究会 (2006年7月、東京)
 14. 小林 恭、中村英二郎、井上貴博、清水洋祐、寺田直樹、賀本敏行、小川 修：S6 kinase signal pathways in human prostate cancer cells. 第7回文部省特定領域「がん」5領域 若手研究者ワークショップ (2006年8月、蓼科)
 15. 松井喜之、西山博之、川西博晃、高橋 毅、賀本敏行、小川 修：尿路上皮癌におけるNQO1修飾による抗癌剤感受性増強機序の解析. 第65回日本癌学会学術総会 (2006年9月、横浜)
 16. 川西博晃、中村英二郎、松井喜之、伊藤将彰、山崎俊成、高橋 毅、西山博之、賀本敏行、妙本 陽、秋山英雄、信正 均、小川 修：細胞培養上清蛋白ショットガンプロテオミクスによる膀胱癌浸潤関連因子の同定. 第65回日本癌学会学術総会 (2006年9月、横浜)
 17. 山崎俊成、中村英二郎、川西博晃、粟倉康夫、神波大己、伊藤哲之、賀本敏行、小川 修、田中祥徳、鄭基晩、秋山英雄、信正 均：血清プロテオーム解析による腎細胞癌腫瘍マーカーの探索. 第65回日本癌学会学術総会 (2006年9月、横浜)
 18. 粟倉康夫、高橋 毅、中村英二郎、伊藤哲之、賀本敏行、小川 修、小谷泰一、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マーカーの探索. 第65回日本癌学会学術総会 (2006年9月、横浜)
 19. Shang, D., Ito, N., Watanabe, J., Awakura, Y., Nishiyama, H., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Synergy of interferon- α and 5-fluorouracil in human renal cell carcinoma requires p53 activity. 第65回日本癌学会学術総会 (2006年9月、横浜)
 20. 清水洋祐、中村英二郎、清川岳彦、吉田 徹、井上貴博、小林 恭、木下秀文、賀本敏行、小川 修：新規アンドロゲン依存性前立腺癌 xenograft モデルの確立. 第65回日本癌学会学術総会 (2006年9月、横浜)
 21. 小林 恭、中村英二郎、寺田直樹、清水洋祐、井上貴博、賀本敏行、小川 修：ヒト前立腺癌細胞株におけるS6K経路制御機構の解析. 第65回日本癌学会学術総会 (2006年9月、横浜)
 22. Shang, D., Ito, N., Watanabe, J., Awakura, Y., Nishiyama, H., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Synergy of interferon- α and 5-fluorouracil in human renal cell carcinoma requires p53 activity. 第44回日本癌治療学会総会学術集会 (2006年10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
Niida et al.	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
Irie et al.	Prediction of glycylsarcosine transport in Caco-2 cell lines expressing PEPT1 at different levels.	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.	23(4)	697-704	2006
Shimakura et al.	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
Tsuda et al.	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
Noshiro et al.	The PDZ domain protein PDZK1 interacts with human peptide transporter PEPT2 and enhances its transport activity.	Kidney Int.	70(2)	275-282	2006
Masuda et al.	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
Terada et al.	Molecular cloning, functional characterization and tissue distribution of rat H ⁺ /organic cation antiporter MATE1.	Pharm. Res.	23(8)	1696-1701	2006
Ogasawara et al.	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
Okuda et al.	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

Shimakura et al.	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
Yonezawa et al.	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
Terada and Inui	Gene expression and regulation of drug transporters in the intestine and kidney.	Biochem. Pharmacol.	73(3)	440-449	2006
Tsuda et al.	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
Uwai et al.	Renal transport of adefovir, cidofovir, and tenofovir by SLC22A family members (hOAT1, hOAT3, and hOCT2).	Pharm. Res.	24(4)	811-815	2007
Nishihara et al.	Pharmacokinetic significance of luminal multidrug and toxin extrusion 1 in chronic renal failure rats.	Biochem. Pharmacol.	24(4)	1482-1490	2007
Asaka et al.	Characterization of the basal promoter element of human organic cation transporter 2 (hOCT2) gene.	J. Pharmacol. Exp. Ther.	In press		
Asaka et al.	Identification of essential histidine and cysteine residues of H ⁺ /organic cation antiporter, Multidrug and Toxin Extrusion (MATE).	Mol. Pharmacol.	In press		
Ogasawara et al.	Hepatocyte nuclear factor-4 α regulates the human organic anion transporter 1 gene in the kidney.	Am. J. Physiol. Renal Physiol.	In press		
Yokoo et al.	Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agents-induced nephrotoxicity.	Biochem. Pharmacol.	In press		
Uwai et al.	Interaction and transport characteristics of mycophenolic acid and its glucuronide via human organic anion transporters hOAT1 and hOAT3.	Biochem. Pharmacol.	In press		

II-C-1: ペプチドトランスポーターPEPTs

II-C-1-1. はじめに

非エステル型の経口用 β -ラクタム抗生物質は、低脂溶性であり、生理的 pH においてイオン化している。それにも関わらず良好な腸管吸収を示すことから、腸管吸収に特殊輸送系の関与していることが 1970 年代後半より示唆されていた。その後、薬物輸送研究に膜小胞系が導入されたことによって、詳細な輸送機構解析が可能となり、1986 年筆者の属する研究室よりはじめて、種々経口用アミノ β -ラクタム抗生物質がペプチドトランスポーターを介して輸送されることが実証された¹⁾。さらに、抗がん剤ベスタチンや、一部のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬など小分子ペプチドと構造的に類似した薬物が、ペプチドトランスポーターを介して輸送されることが報告され、ペプチドトランスポーターは様々な薬物の腸管吸収を媒介していることが明らかになった。

ペプチドトランスポーターの分子の実体は、1994 年、Hediger 並びに Leibach らのグループによるウサギ小腸 RNA を用いた発現クローニングによって同定され、PEPT1 と名付けられた²⁾。現在 PEPT1 は、Human Genome Organization による SLC 分類では、SLC15A1 となる。ついで PEPT1 のホモログとして、腎 cDNA ライブラリーよりヒト PEPT2 (SLC15A2) が単離された³⁾。われわれは、ラット腎 cDNA ライブラリーから PEPT1 及び PEPT2 の cDNA をクローニングし^{4,5)}、両者の特性について比較解析を行ってきた (図 1)^{6,7)}。両トランスポーターは約 50% のアミノ酸ホモロジーを示す推定 12 回膜貫通型タンパクであり、PEPT1 は低親和性型、PEPT2 は高親和性型のトランスポーターとして機能している。臓器分布としては、PEPT1 が小腸>腎臓に発現しているのに対して、PEPT2 は腎臓>>脳・肺・乳腺・脾臓など多くの臓器に発現している。ヒト消化管における PEPT1 の発現分布について精査したところ、PEPT1 は十二指腸>空腸>回腸の順に発現していること、また腸上皮化生に伴い胃にも発現していることが示されている⁸⁾。従来、ペプチドトランスポーターの機能はペプチド吸収という観点から、主に小腸や腎臓で解析が行われてきたが、遺伝子クローニング以降、小腸や腎臓以外での臓器における局在や機能解析に関する報告がなされ^{9,10)}、ペプチドトランスポーターの新たな生理機能や薬物動態学的役割が明らかにされつつある。

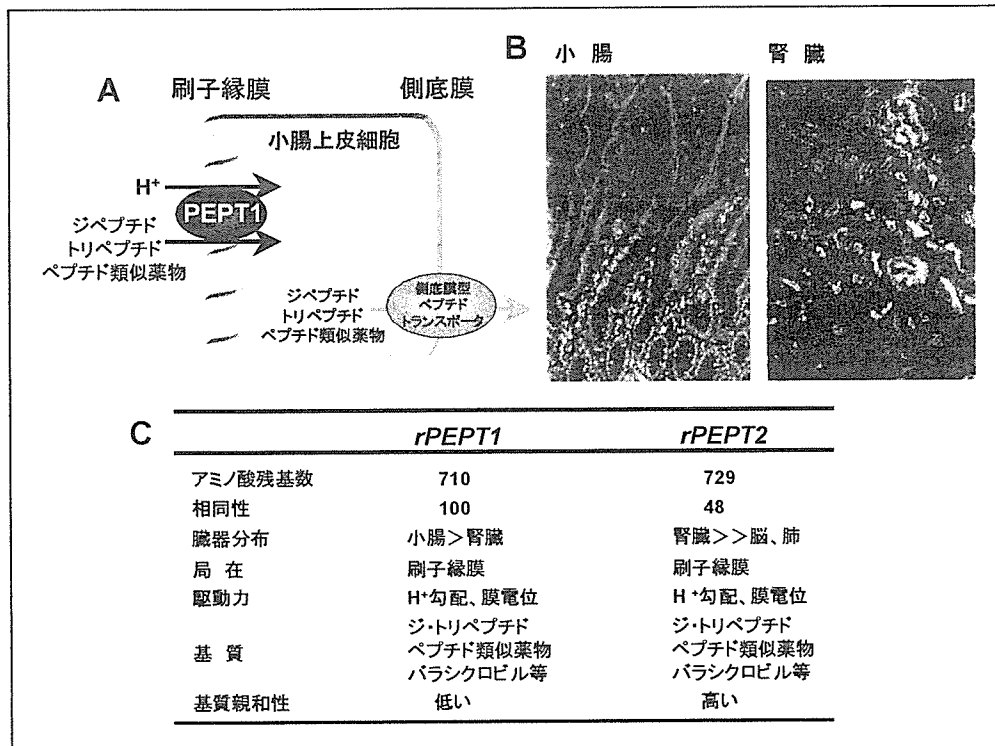


図 1. ペプチドトランスポーターの特徴

- A. 小腸上皮細胞におけるペプチドトランスポーターの役割. 小腸上皮細胞の刷子縁膜には PEPT1 が、また側底膜には側底膜型ペプチドトランスポーター (分子実体は未同定) が発現し、ジペプチドやトリペプチド並びにペプチド類似薬物の経上皮輸送を媒介している。
- B. 小腸及び腎尿細管上皮細胞における PEPT1 の免疫組織染色. PEPT1 は小腸及び腎尿細管上皮細胞の刷子縁膜に局在している。
- C. ラット PEPT1 及び PEPT2 の比較. 両トランスポーターの局在、駆動力、基質認識特性は類似しているが、臓器分布並びに基質親和性が異なる。

II-C-1-2. PEPT1 の基質特異性と薬物送達への応用

ペプチドトランスポーターの生理的基質であるジペプチドおよびトリペプチドは、遊離のアミノ基とカルボキシル基、並びにペプチド結合を有することから、当初、これらの構造がペプチドトランスポーターに認識・輸送されるための必要十分条件であると考えられていた。しかし基質特異性に関する研究が進展し、これらの条件を充たさない化合物でも、ペプチドトランスポーターの基質になることが明らかになり、その条件は以前考えられていたほど単純ではないことが判明した。顕著な例としては、最も重要な構造であると考えられていたペプチド結合を持たなくとも、基質になりうる化合物 (valacyclovir など) が挙げられる。

Valacyclovir (商品名 VALTREX) は抗ウイルス薬 acyclovir の経口吸収性を改善したプロドラッグであり、acyclovir にアミノ酸のバリンをエステル結合させた構造を有している。修飾するバリンの L 体と D 体の間で acyclovir の尿中回収率が異なったことから、開発当初から valacyclovir の

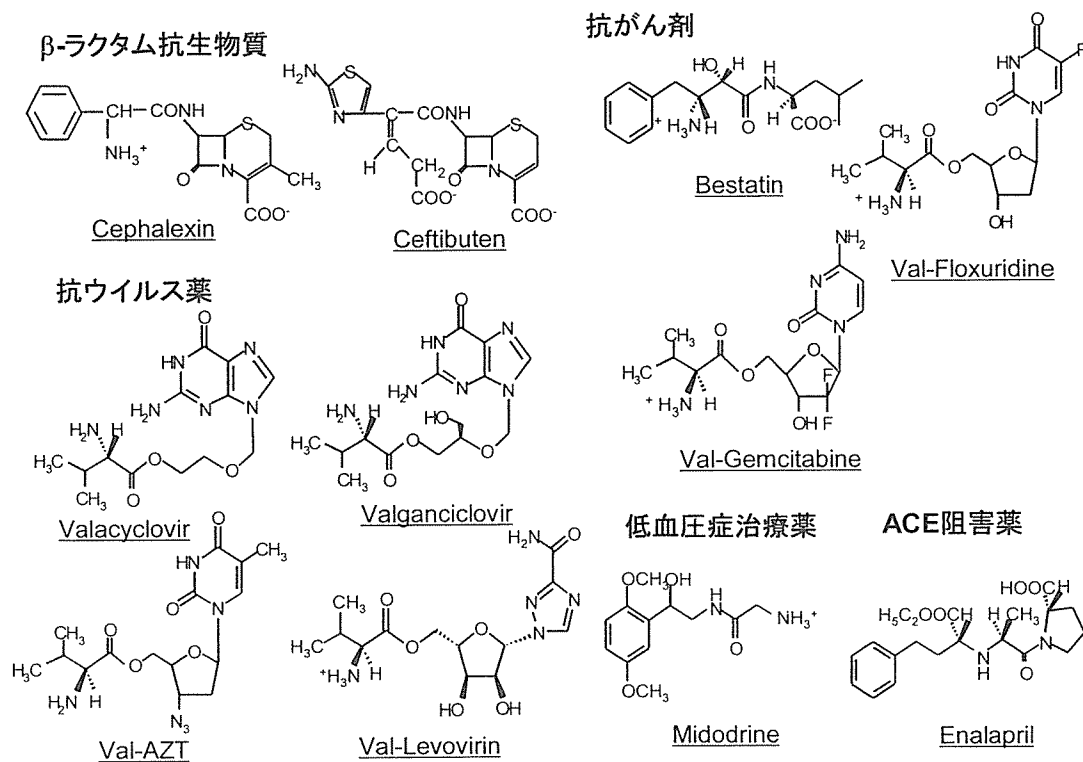


図 2. PEPT1 によって輸送される薬物

古典的には経口用β-ラクタム抗生物質、抗がん剤 bestatin、ACE 阻害薬などが知られているが、最近では低血圧症治療薬 midodrine や、抗ウイルス薬や抗がん剤のバリンエステル誘導体が、PEPT1 の基質になることが報告されている。

吸収には何らかのトランスポーターが関与していると考えられていた。その後、Amidon らのグループによって、valacyclovir が PEPT1 によって輸送されることが明らかにされ、バリンによるエステル修飾が難吸収性薬物の吸収改善に有効であることが示された¹¹⁾。現在、バリンのエステル結合により PEPT1 の基質になることが報告されている薬物としては、抗ウイルス薬 zidovudine (AZT)、ganciclovir (バリン誘導体: valganciclovir (商品名 VALIXA))、levovirin、抗がん薬 floxiuridine などが挙げられる (図 2)。

また難吸収性薬物をアミノ酸とのペプチド結合によりペプチド様薬物とし PEPT1 の基質に変換することは、古くからのアイデアとして提唱されていた¹²⁾が、実際医薬品の開発に応用された例はなかった。我々は最近、低血圧症治療薬 midodrine (図 2, 商品名 METLIGINE) が PEPT1 の基質になることを見出した¹³⁾。すなわち、midodrine は活性本体である 1-(2', 5'-dimethoxyphenyl)-2-aminoethanol (DMAE) をグリシンとペプチド結合させたプロドラッグであり、プロドラッグ化により、バイオアベイラビリティが約 50% から 100% に改善されることが知られている。DMAE の種々アミノ酸誘導体を合成し、PEPT1 との親和性や *in vivo* における安定性を検討したところ、修飾するアミノ酸はグリシンが適していることが明らかになった。後付けではあるが、midodrine

は PEPT1 の機能特性をうまく利用して開発された医薬品といえよう。今後、注射薬として開発された低分子医薬品の経口薬への変換や、難吸収性が開発上問題となっている低分子化合物については、上述したアミノ酸修飾により PEPT1 の基質に変換するという吸収改善 strategy が、医薬品開発の一つの選択肢として有効であろう。

II-C-1-3. PEPTs の構造・機能相関とシミュレーション

ペプチドトランスポーターの遺伝子クローニングによって、輸送の分子機序に関する研究が可能になり、散発的ではあるが部位特異的変異導入法や PEPT1/PEPT2 のキメラ構築によって、ペプチドトランスポーターの構造・機能相関に関する情報が集積しつつある。これまで、 H^+ 勾配と共役する様々なトランスポーターにおいて、ヒスチジン残基が機能的に重要な役割を果たしていることが示唆されてきたが、PEPT1 においても、第 2 及び第 4 番目の推定膜貫通領域に存在するヒスチジン残基が、 H^+ 結合部位並びに基質結合部位として機能していることが示唆されている¹⁴⁻¹⁶。その他現在得られている情報としては、第 2, 5, 7 及び 10 番目の推定膜貫通領域に存在するチロシン残基などが、輸送活性に重要な役割を果たしていることが報告されている。また、キメラ構築に基づく解析から、N 末端領域に基質結合部位の存在することが示唆されている¹⁷。しかしこれらの情報を統合しても、ペプチドトランスポーターがどのように基質を認識し、輸送しているかはほとんど解明されていない。

そこでこれらの手法とはまったく異なるアプローチとして、数理的モデルとコンピュータシミュレーションを活用し、PEPT1 の輸送機序解明を試みた¹⁸。詳細は割愛するが、PEPT1 の基質である glycylsarcosine (両性イオン) と ceftibuten (アニオン) の各 pH における詳細な速度論解析と文献情報に基づき、 H^+ は H^+ 結合部位だけでなく基質認識部位にも結合し、基質の結合に影響を及ぼすと仮説を立てた (図 3)。推測したメカニズムから 14 状態モデルを導き、コンピュータシミュレーションによって PEPT1 の機能を再現したところ、glycylsarcosine 輸送の濃度依存性や pH 依存性、膜電位依存性を精度良く再現できることが判明した。さらに、ceftibuten や midodrine (カチオン) 並びにチャージを有するジペプチドの輸送も予測できたことから、推測したメカニズムの妥当性が示唆された。

ペプチドトランスポーターの広範な基質認識特性がいかにして担保されているかは、古くて新しい課題であるが、最近では有機化学の研究者らも様々な化合物の合成を通して、この問題にチャレンジしている¹⁹。また、大腸菌における種々トランスポーターの結晶化とそれに引き続く構造解析を応用して、薬物トランスポーターの立体構造解析も可能な時代になりつつある²⁰。今後はこれら異分野における様々なコンセプトや技術を積極的に取り込んで、ペプチドトランスポーターの輸送機序、基質認識特性に関する研究が学際的に発展することが期待される。

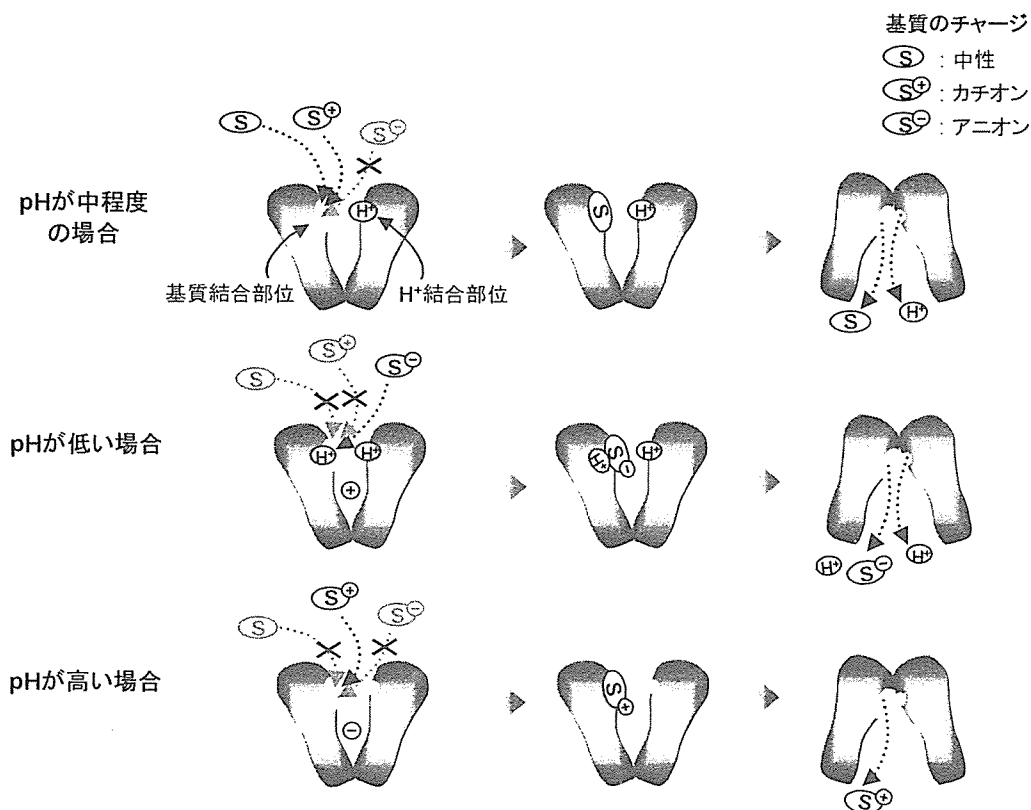


図3. PEPT1による荷電状態の異なる基質とH⁺共輸送の推定メカニズム

PEPT1は、基質結合部位とH⁺結合部位を1つずつ有し、pHが低い場合は、H⁺がH⁺結合部位だけでなく基質認識部位にも結合しうる。一方、基質の結合パターンはチャージによって異なり、中性のものはH⁺化された基質認識部位へは結合できない。対称的に、負の電荷を帯びた基質は、H⁺化された基質認識部位にのみ結合でき、2つのH⁺と共輸送される。また正の電荷を帯びた基質は、H⁺結合部位にH⁺が結合していても、基質結合部位へ結合できる。これらの推定メカニズムを、コンピューターシミュレーションによって検証したところ、これまで報告されているPEPT1の機能を精度良く再現することができた¹⁸⁾。

II-C-1-4: ペプチドトランスポーターの調節機構

小腸PEPT1の活性や発現は、食餌、ホルモン、発育、日リズムあるいは、ある種の薬物処理など様々な条件によって調節されることが報告されている²¹⁾。例えば、ラット小腸PEPT1の発現や輸送活性には、暗期に高く明期に低い日内リズムが存在し、この日内リズムに応じて、経口用β-ラクタム抗生物質の体内動態が変動すること、また、摂食条件によってPEPT1日内リズムの変動することが知られている²²⁻²⁴⁾。上述した調節の多くは、PEPT1 mRNAの発現が変化することによって起こることが示されているが、PEPT1の転写制御機構については情報が乏しかった。そこで我々は、ヒトPEPT1のプロモーター解析を行い、基礎的あるいは臓器特異的な発現に関与する転写因子の同定を試みた。

PEPT1プロモーター領域のdeletion analysisの結果、転写開始部位の上流35から172 bp間の領域がPEPT1の転写活性に重要であることが明らかとなった。この領域にはTATA boxは存在せず、

基礎転写因子の一つである Sp1 が結合するとされる GC box が複数存在した。これら推定 Sp1 結合サイトにそれぞれ変異を導入することにより転写活性は低下し、また、Caco-2 細胞の核抽出液を用いた Gel Shift Assay より、推定 Sp1 結合サイトと Sp1 の結合が確認された。さらに、PEPT1 の転写活性は、Sp1 の過剰発現により上昇し、Sp1 と DNA との結合阻害剤である mithramycin A 処理により低下した。これらの結果から、ヒト PEPT1 プロモーターの basal activity には、Sp1 が複数の結合部位を通して寄与していることが示された²⁵⁾。

Sp1 の発現分布はユビキタスであり、PEPT1 の小腸特異的な発現を説明することはできない。そこで、PEPT1 の組織特異性を規定する因子の候補として、腸管特異的な転写因子であり、小腸上皮細胞の分化や機能維持に重要な役割を果している Cdx2 に着目し解析を行った²⁶⁾。Caco-2 細胞で Cdx2 を過剰発現させた場合、PEPT1 のプロモーター活性は顕著に上昇したが、プロモーター上における Cdx2 の反応領域は basal activity に重要であった領域と同一であり、Cdx2 の結合配列は存在しなかった。そこで、Cdx2 の作用機序について、共発現系、クロマチン免疫沈降法等の検討を加えた結果、Cdx2 は Sp1 と相互作用することにより PEPT1 プロモーター領域に作用し、転写を活性化させることが示された (図 4)。また、ヒトの胃組織 (腸上皮化生の検体を含む) における PEPT1 と Cdx2 の mRNA 発現量は良好な相関を示し、PEPT1 発現調節における Cdx2 の重要性が *in vivo* の面からも示された。今後は、食餌、ホルモン、日リズムなどの刺激による PEPT1 の発現調節が、どのような転写因子によって制御されているのかを解明していくことが課題である。

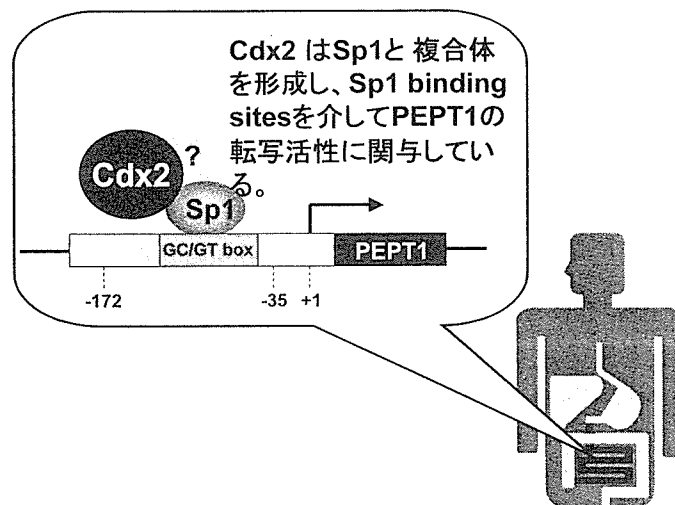


図 4. PEPT1 の転写制御機構

PEPT1 の基礎転写には Sp1 が、また小腸特異的な発現には Cdx2 が関与している²⁵⁻²⁶⁾。Cdx2 は PEPT1 のプロモーター領域に直接結合せず、Sp1 を介して PEPT1 の転写を制御している。

II-C-1-4. おわりに

PEPT1 のクローニング以降、膨大な数のペプチドトランスポーターに関する情報が集積してきた。今後、これらの情報をどのように創薬や医薬品適正使用に応用していくかが、創薬・動態研究者の腕の見せ所だと思う。本稿では述べなかつたが、潰瘍性大腸炎・クローン病などの炎症性腸疾患時には、元来発現の見られない大腸において PEPT1 が過剰発現し、大腸菌の産生する白血球走化性因子 N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) を輸送することによって、慢性炎症に関与していることが示唆されている²⁷⁻²⁸⁾。従って PEPT1 は薬効の標的分子として捉えることも可能であり、今後これら疾患時における、大腸 PEPT1 をターゲットとした、新たな薬物療法や栄養療法の開発も期待される。

参考文献

- 1) Okano T., Inui K., Maegawa H. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **261**, 14130-14134 (1986).
- 2) Fei YJ., Kanai Y., Nussberger S. *et al.*, *Nature*, **368**, 563-566 (1994).
- 3) Liu W., Liang R., Ramamoorthy S. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1235**, 461-466 (1995).
- 4) Saito H., Okuda M., Terada T. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 1631-1637 (1995).
- 5) Saito H., Terada T., Okuda M. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1280**, 173-177 (1996).
- 6) Inui K. and Terada T., Dipeptide transporters. ed. by Amidon G. and Sadee W., In *Membrane Transporters as Drug Targets*, p269-288, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (1999).
- 7) Terada T. and Inui K., *Curr. Drug Metab.*, **5**, 85-94 (2004).
- 8) Terada T., Shimada Y., Pan X. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 1756-1763 (2005).
- 9) Groneberg DA, Nickolaus M, Springer J. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **158**, 707-714 (2001).
- 10) Fujita T., Kishida T., Wada M. *et al.*, *Brain Res.*, **997**, 52-61 (2004).
- 11) Han H., de Vruet R.L., Rhie J.K. *et al.*, *Pharm. Res.*, **15**, 1154-1159 (1998).
- 12) Tsuji A., Tamai I., Nakanishi, M. *et al.*, *Pharm. Res.*, **7**, 308-309 (1990).
- 13) Tsuda M., Terada T., Irie M. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **318**, 455-460 (2006).
- 14) Terada T., Saito H., Mukai M. *et al.*, *FEBS Lett.*, **394**, 196-200 (1996).
- 15) Uchiyama T., Kulkarni A.A., Davies D.L. *et al.*, *Pharm. Res.*, **20**, 1911-1916 (2003).
- 16) Terada T., Saito H. and Inui K., *J. Biol. Chem.*, **273**, 5582-5585 (1998).
- 17) Terada T., Saito H., Sawada K. *et al.*, *Pharm. Res.*, **17**, 15-20 (2000).
- 18) Irie M., Terada T., Katsura T. *et al.*, *J. Physiol. (Lond.)*, **565**, 429-439 (2005).
- 19) Niida A, Tomita K, Mizumoto M. *et al.*, *Org. Lett.*, **8**, 613-616 (2006).
- 20) Popp C., Gorboulev V., Muller T.D. *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **67**, 1600-1611 (2005).
- 21) Adibi S.A., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **285**, G779-G788 (2003).
- 22) Pan X., Terada T., Irie M. *et al.*, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **283**, G57-G64 (2002).
- 23) Pan X., Terada T., Okuda M. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **307**, 626-632 (2003).
- 24) Pan X., Terada T., Okuda M. *et al.*, *J. Nutr.*, **134**, 2211-2215 (2004).
- 25) Shimakura J., Terada T., Katsura T. *et al.*, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **289**, G471-G477 (2005).
- 26) Shimakura J., Terada T., Shimada Y. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **71**, 1581-1588 (2006).
- 27) Merlin D., Si-Tahar M., Sitaraman SV. *et al.*, *Gastroenterology*, **120**, 1666-1679 (2001).
- 28) Buysse M., Tsocas A., Walker F. *et al.*, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **283**, C1795-C1800 (2002).

Unequivocal Synthesis of (*Z*)-Alkene and (*E*)-Fluoroalkene Dipeptide Isosteres To Probe Structural Requirements of the Peptide Transporter PEPT1

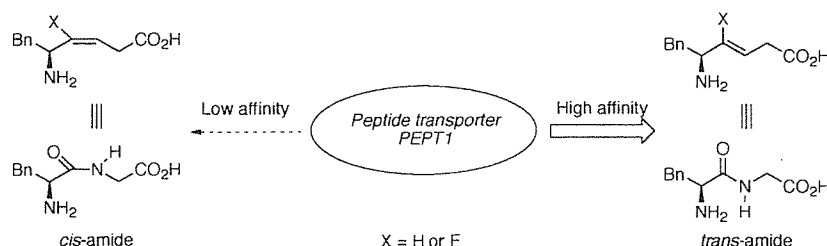
Ayumu Niida,[†] Kenji Tomita,[†] Makiko Mizumoto,[†] Hiroaki Tanigaki,[†] Tomohiro Terada,[‡] Shinya Oishi,[†] Akira Otaka,^{†,§} Ken-ichi Inui,[‡] and Nobutaka Fujii^{*,†}

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan, Department of Pharmacy, Kyoto University Hospital, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan, and Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima, Tokushima 770-8505, Japan

n Fujii@pharm.kyoto-u.ac.jp

Received November 17, 2005

ABSTRACT



Described is a novel synthetic route for dipeptide isosteres containing (*Z*)-alkene and (*E*)-fluoroalkene units as *cis*-amide bond equivalents via organocopper-mediated reduction of γ -acetoxo- or γ,γ -difluoro- α,β -unsaturated- δ -lactams. The synthesized isosteres were evaluated in terms of their affinities for the peptide transporter PEPT1. *trans*-Amide isosteres tended to possess higher affinities for PEPT1 as compared to the corresponding *cis*-amide bond equivalents.

In postgenomic drug discovery research, the rapid elucidation of structural requirements of the ligands for newly identified drug targets (e.g., GPCRs, enzymes, transporters, etc.) is strongly needed in the arena of medicinal chemistry.¹ Many protein drug targets interact with proteinic or peptidic ligands. Therefore, development of peptidomimetic small molecules is important for investigating criteria for the mutual molecular recognition.² Alkene-type dipeptide isosteres represent potential amide bond mimetics (Figure 1).³ Fluoroalkene dipeptide isosteres were designed as electrostatically favor-

able mimetics as compared to simple alkene isosteres.⁴ These isosteres have structural similarities with the parent peptides

(2) (a) Burgess, K. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 826. (b) Bursavich M. G.; Rich, D. H. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 541. (c) Hruby, V. J. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4215.

(3) (a) Oishi, S.; Kamano, T.; Niida, A.; Odagaki, Y.; Hamanaka, N.; Yamamoto, M.; Ajito, K.; Tamamura, H.; Otaka, A.; Fujii, N. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6162. (b) Wipf, P.; Xiao, J. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 103. (c) Xiao, J.; Weisblum, B.; Wipf, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5742.

(4) (a) Abraham, R. J.; Ellison, S. L. R.; Schonholzer, P.; Thomas, W. A. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 2101. (b) Allmendinger, T.; Furet, P.; Hungerbühler, E.; *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7297. (c) Allmendinger, T.; Furet, P.; Hungerbühler, E.; *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7301. (d) Otaka, A.; Watanabe, J.; Yukimasa, A.; Sasaki, Y.; Watanabe, H.; Kinoshita, T.; Oishi, S.; Tamamura, H.; Fujii, N. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1634. (e) V. d. Veken, P.; Senten, K.; Kertész, I.; D. Meester, I.; Lambeir, A.-M.; Maes, M.-B.; Scharpè, S.; Haemers, A.; Augustyns, K. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1768. (f) Nakamura, Y.; Okada, M.; Sato, A.; Horikawa, H.; Koura, M.; Saito, A.; Taguchi, T. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5741.

[†] Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University.

[‡] Kyoto University Hospital.

[§] The University of Tokushima.

(1) (a) Drews, J. *Science* **2000**, *287*, 1960. (b) Klabunde, T.; Hessler, G. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 928. (c) Tyndall, J. D. A.; Pfeiffer, B.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 793.

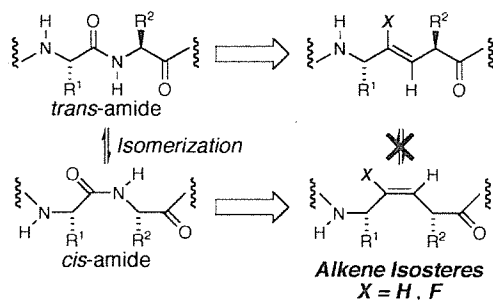


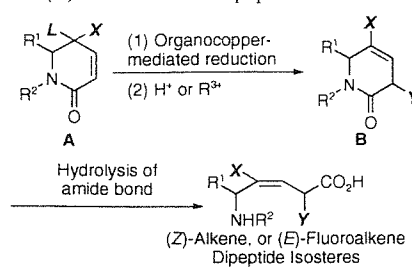
Figure 1. *Cis/trans* equilibrium of peptide bond and the corresponding alkene- or fluoroalkene isosteres.

and resist enzymatic degradation. Peptide bonds exist in *cis/trans* equilibrium, while alkene isosteres serve as defined *trans*-amide or *cis*-amide equivalents, which do not isomerize to each other. *Cis/trans* isomerization of peptide bonds (especially Xaa-Pro sequences) in several bioactive peptides tends to play an important role in their conformations and biological activities.⁵ Therefore, alkene and fluoroalkene isosteres might be promising tools for conformational analysis of bioactive peptides and proteins.⁶ We have been engaged in the development of synthetic methodologies for (*E*)-alkene or (*Z*)-fluoroalkene dipeptide isosteres as *trans*-amide bond equivalents utilizing organocopper reagents or SmI_2 . However, the lack of efficient synthetic methodologies for the preparation of (*Z*)-alkene or (*E*)-fluoroalkene dipeptide isosteres as *cis*-amide bond equivalents has limited an extensive application of alkene and fluoroalkene isosteres in the analysis of amide bond geometries in bioactive peptides and proteins. In this paper, we describe a new synthetic approach for the preparation of (*Z*)-alkene or (*E*)-fluoroalkene dipeptide isosteres. We also include the application of these isosteres to probe structural requirements of the peptide transporter PEPT1.

Our synthetic routes for the preparation of (*Z*)-alkene and (*E*)-fluoroalkene isosteres are depicted in Scheme 1. We envisioned key synthetic intermediates **B** would be synthesized by organocopper-mediated reduction of lactam **A** with predominant formation of β,γ -(*Z*)-alkenes or (*E*)-fluoroalkenes as *cis*-amide equivalents. This strategy could be expanded into consecutive one-pot reduction/ α -alkylation methodologies for the synthesis of structurally diverse α -alkylated (*Z*)-alkene and (*E*)-fluoroalkene dipeptide isosteres.⁷ First, we synthesized γ -acetoxy- or γ,γ -difluoro- α,β -unsaturated lactams and examined the organocopper-mediated reduction of these substrates to confirm whether this approach was applicable to the synthesis of *cis*-amide bond isosteres.

Guibé et al. reported a similar but inherently different convergent approach to the synthesis of (*Z*)-alkene isosteres

Scheme 1. Synthetic Route for (*Z*)-Alkene and (*E*)-Fluoroalkene Dipeptide Isosteres



L: leaving group (OAc or F). X: H or F. Y: H or R^3 .

via 3,6-dihydropyridin-2-ones, in which the β,γ -(*Z*)-alkene unit was constructed by Grubbs' RCM after condensation of chiral allylamines with chiral vinyl acetic acids.⁸ The present method provides a new entity for the synthesis of (*Z*)-alkene isosteres in a divergent fashion. That is complementary to their method as well as our alternative method based on organocopper-mediated *anti*- $\text{S}_{\text{N}}2'$ reaction.⁹ It is noteworthy that to our knowledge, this is the first unequivocal synthesis of (*E*)-fluoroalkene dipeptide isosteres.

Substrates for the organocopper-mediated reduction were synthesized by the sequence of reactions shown in Scheme 2. Synthesis of acetate **6** started from a known phenylalanine derivative **1**.⁹ Conversion of the *N*-protecting group of **1** to *N*-Ns (Ns = 2-nitrobenzenesulfonyl)¹⁰ followed by *O*-protection with a TBS group gave *N*-Ns amide derivative **2**. Treatment of **2** with DMB (2,4-dimethoxybenzyl) alcohol under Mitsunobu conditions afforded the *N*-DMB sulfonamide **3**. After removal of the *N*-Ns group of **3**, acylation of the resulting secondary amine followed by *O*-TBS deprotection gave the acrylamide derivative **4**. RCM reaction of **4** with Grubbs' ruthenium catalyst¹¹ proceeded smoothly at room temperature to yield the γ -hydroxy- α,β -unsaturated δ -lactam **5**. Lactam **5** was converted to acetate **6** by Ac_2O treatment in the presence of pyridine.

γ,γ -Difluoro- α,β -unsaturated δ -lactam **12** was synthesized from the β -amino ester **10**, which was prepared from phenylacetaldehyde **7** and the chiral amine **8** via rhodium catalyzed diastereoselective Reformatsky–Honda reaction.^{4d,12} After DIBAL-H treatment of **10**, (*Z*)-selective Horner–Wadsworth–Emmons reaction¹³ of the resulting aldehyde gave (*Z*)-enoate **11** in 72% yield with a concomitant formation of small amount of (*E*)-isomer (4%). After deprotection of the Boc and *t*-Bu groups of **11** using 4 M HCl in dioxane, cyclization with EDC gave the desired lactam **12**.

(8) Boucard, V.; S.-Dorizon, H.; Guibé, F. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7275.

(9) Niida, A.; Oishi, S.; Sasaki, Y.; Mizumoto, M.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Otake, A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4183.

(10) Fukuyama, T.; Jow, C.-K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6373.

(11) Scholl, M.; Ding, S.; Lee, C. W.; Grubbs, R. H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 953.

(12) Honda, T.; Wakabayashi, H.; Kanai, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 307.

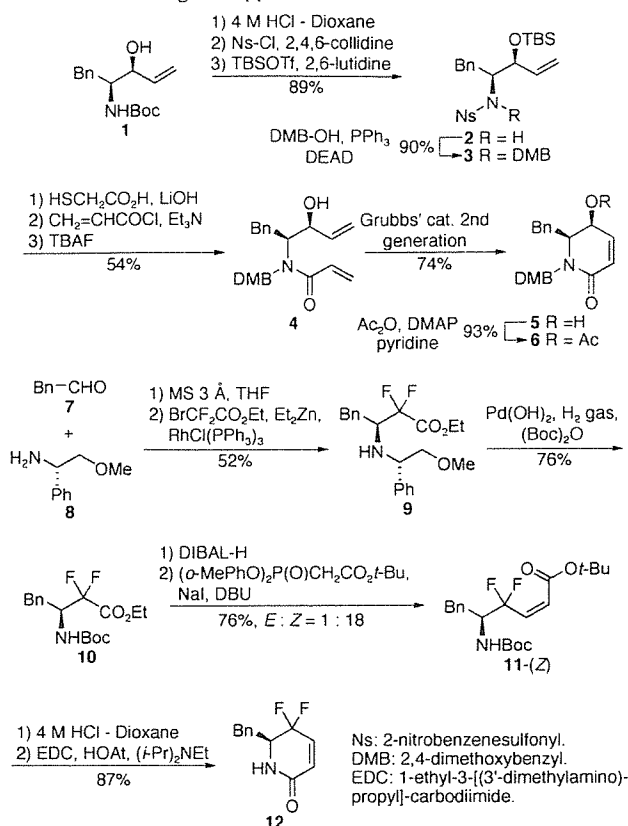
(13) Ando, K.; Oishi, T.; Hiram, M.; Ohno, H.; Ibuka, T. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4745.

(5) Dugave, C.; Demange, L. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2475.

(6) Wang, X. J.; Xu, B.; Mullins, A. B.; Neiler, F. K.; Etkorn, F. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15533.

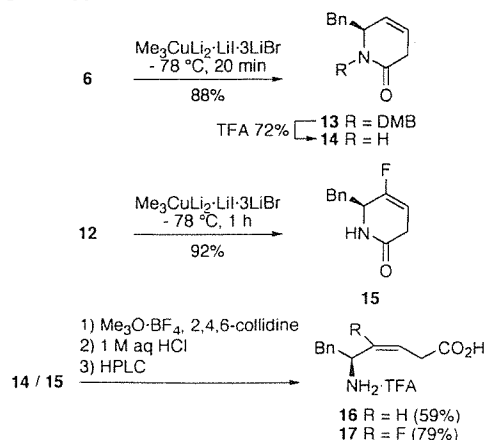
(7) Otake, A.; Watanabe, H.; Yukimasa, A.; Oishi, S.; Tamamura, H.; Fujii, N. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5443, and references cited therein.

Scheme 2. Synthesis of Requisite Substrates for Organocopper-Mediated Reduction



Next we examined the organocopper-mediated reduction of lactams **6** and **12** (Scheme 3). The reaction of acetate **6** with Me₃CuLi₂·LiI·3LiBr¹⁴ proceeded smoothly at -78 °C to yield the β,γ-unsaturated lactam **13** in a good yield (88%). The DMB group of lactam **13** was easily removed using TFA. Treatment of difluorolactam **12** with Me₃CuLi₂·LiI·

Scheme 3. Synthesis of Phe-Gly Type (Z)-Alkene- and (E)-Fluoroalkene Dipeptide Isoesters via Organocopper-Mediated Reduction of Lactams **6** and **12**

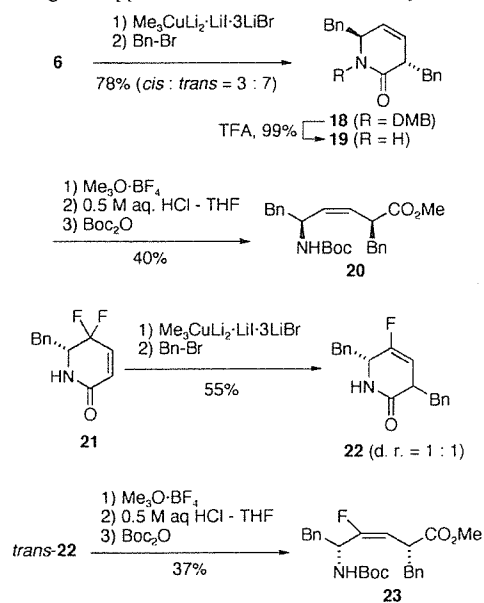


3LiBr also gave the desired reduction product **15** in excellent yield (92%).

Next, we carried out the hydrolysis of the amide bond in lactams **14** and **15** to accomplish the synthesis of the *cis*-amide bond isosteres. Lactams **14** and **15** were converted to lactim ethers using Me₃O·BF₄. Hydrolysis of the lactim ethers¹⁵ under acidic conditions followed by HPLC purification using 0.1% TFA aqueous MeCN gave Phe-Gly type (Z)-alkene dipeptide isostere (Phe-ψ[(Z)-CH=CH]-Gly **16**) and (E)-fluoroalkene dipeptide isostere (Phe-ψ[(E)-CF=CH]-Gly **17**),¹⁶ respectively as TFA salts.

The above organocopper-mediated reduction is applicable to consecutive one-pot α-alkylation (Scheme 4). After

Scheme 4. Synthesis of α-Substituted (Z)-Alkene and (E)-Fluoroalkene Dipeptide Isoesters Utilizing Organocopper-Mediated Reduction–Alkylation



reduction of lactam **6** with Me₃CuLi₂·LiI·3LiBr, the resulting metal enolate was trapped by Bn-Br to yield the *trans*-α-substituted diketopiperazine mimetic **18** as a main product. After deprotection of the DMB group using TFA, the resulting lactam **19** was subjected to ring-opening followed by *N*-Boc protection to yield Boc-L-Phe-ψ[(Z)-CH=CH]-D-Phe-OMe **20** in 40% yield with a small amount of α-epimerized product (13%). Boc-D-Phe-ψ[(E)-CF=CH]-L-Phe-OMe **23** was also synthesized from lactam **21** by a procedure

(14) Single electron transfer (SET) mechanism has been proposed as one of the plausible mechanisms of organocopper-mediated reduction. The electron-transfer potency of Me₃CuLi₂ was proved to be higher than that of the corresponding Gilman-type reagent such as Me₂CuLi. See: Chouhan, Y.; Horino, H.; Ibuka, T.; Yamamoto, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, *70*, 1953.

(15) Schöllkopf, U.; Hartwig, W.; Pospischil, K.-H.; Kehne, H. *Synthesis* **1981**, 966.

(16) Coupling constants of **17** and **23** (³J_{H_F} = 20.7 and 20.5 Hz, respectively) are consistent with those of α-fluorovinyl groups possessing a (E)-configuration (³J_{H_F} = 18–22 Hz). See ref 4b.