

厚生労働科学研究研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業  
(トキシコゲノミクス研究)

薬物の毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の  
推定と毒性回避を指向したスクリーニング系の開発

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉山 雄一

平成19(2007)年3月

## 目 次

I. 総括研究報告	
薬物トランスポーターの分子多様性と機能解析および副作用発現との連鎖解析 杉山雄一	1
II. 分担研究報告	
1. 薬物の効果・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の in vitro 実験系 からの推定と、毒性回避のための in vitro スクリーニング系の開発 杉山雄一	8
2. 薬効・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の推定のための臨床研究 家入一郎	15
3. 薬剤代謝・トランスポーター遺伝子の SNP 解析キットの開発 徳永勝士	17
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

薬物の毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の推定と毒性回避を指向したスクリーニング系の開発

主任研究者 杉山雄一・東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室・教授

研究要旨 本年度は、ノックアウト動物ならびに *in vitro* 実験系を用いた解析を通じて、薬物の体内動態のみならず、局所への薬物の集積による薬効・毒性をも加味した解析を進めた。(1) adefovir の腎毒性を決定する要因として、輸送担体 OAT1, MRP4 の関与および毒性発現に必須なリン酸化への adenylate kinase 2,4 の関与を示した。(2) 精神神経系や生殖系の毒性を決める組織蓄積における BCRP の重要性を示した。(3) Mrp3 の体内動態への関与を示すとともに、Mrp3, 4 の重要性を簡便に評価する *in vitro* マルチ発現系 (OATP1B1/MRP2/MRP3 or MRP4) の構築に成功した。(4) 臨床研究を通して、pitavastatin の薬物動態と OATP1B1 ならびに BCRP の遺伝子多型との関連および metformin の薬効と OCT1 の遺伝子多型との関連を明らかにした。(5) マルチプレックス SNP タイピング技術をさらに改良し、磁気ビーズを必要とせず、簡便化、低コスト化を実現した DigiTag2 法を確立した。

#### 分担研究者

家入一郎（九州大学大学院薬学研究院・准教授）

徳永勝士（東京大学大学院医学系研究科・教授）

#### A.研究目的

薬物の効果の個人差や副作用を引き起こすヒトの遺伝的要因について、遺伝子ノックアウト動物や遺伝子発現細胞などを用いて、特定の薬物動態・薬効・副作用に関係する分子が毒性に与える影響を定量的に観察することで、毒性関連候補遺伝子を推測する。上記実験の結果に基づき、遺伝子多型との関連を探る臨床研究を行い、さらに候補 SNPs を迅速に診断できるチップの開発を行うことで、臨床医療に成果を還元できるように検証実験を行う。

#### B.研究方法

(1) 抗HIV治療薬 adefovir の腎毒性発現に関与する輸送担体・代謝酵素の同定

腎取り込みトランスポーター OAT1, OAT3 発現 HEK293 細胞における adefovir の取り込みを測定し、あわせてヒト腎スライスにおける経時的な adefovir の取り込みを観察した。腎排泄側トランスポーターの解析について

は、MRP4 発現膜ベシクルを用いた取込みを観察するとともに、MRP4 ノックアウトマウスを用いて、adefovir の定常状態における血中濃度ならびに腎臓内濃度を比較した。

次に、adefovir の毒性発現のために必須であるリン酸化に関与する酵素群を同定する目的で、adenylate kinase (AK) 2, 3, 4 を発現 HEK293 細胞を作製し、adefovir の濃度依存的な細胞増殖抑制効果を観察した。また、ミトコンドリアへの adefovir の取り込み機構を明らかにするために、単離ミトコンドリアへの [<sup>3</sup>H]dCTP の取込みに対する adefovir ならびに adefovir の 2 リン酸化体の影響を観察した。

(2) 脳および精巣への薬物・外来異物の移行における BCRP の関与

BCRP 発現 MDCKII 細胞ならびに Mdr1a 発現 LLC-PK1 細胞を transwell 上に播種し、basal および apical 方向への経細胞輸送を観察した。BCRP ノックアウトマウスと野生型マウスを用いて定常状態における薬物の脳および精巣対血漿中濃度比を比較した。

(3) 肝血管側膜上に存在する MRP3, MRP4 が薬物の体内動態に与える影響に関する検討

MRP3, MRP4 それぞれのノックアウトマウスおよび野生型マウスを用いて、薬物を

静脈内投与後の血中濃度推移の違いを観察した。さらに、MRP3, MRP4の機能をin vitro実験における経細胞輸送の変化でとらえることのできる新規実験系であるトリプルトランスフェクタントを構築した。本発現系は、ヒトOATP1B1/MRP2共発現系に、MRP3, MRP4それぞれを発現できるアデノウィルスを感染させることで、3つのトランスポーターを同時に極性細胞であるMDCKII細胞に発現させた発現細胞である。これをtranswell上に播種し、共発現系におけるbasalからapical方向への薬物の輸送と比較することで、MRP3, MRP4の経細胞輸送に与える影響について考察を行い、in vivoノックアウトマウスから得られた結果との比較を試みた。

(4) 薬効・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の推定のための臨床研究

4-1 OATP1B1 および BCRP 遺伝子多型で層別化した健常成人に pitavastatin を単回経口投与したのちの血中濃度推移を観察した。

4-2 メトホルミンを服用する糖尿病患者を対象とし、HbA1c を指標に感受性、耐性群に層別し、OCT1, OCT2 遺伝子多型と効果との関連について検討を加えた。

(5) 薬物代謝・トランスポーター遺伝子の SNP 解析キットの開発

磁気ビーズを必要とせず、簡便化、低コスト化を実現した DigiTag2 法を開発し、それを用いて、96 箇所の SNP を対象としたマルチプレックス SNP タイピングを 48 検体について行った。さらに、GenomiPhi DNA amplification kit, Amersham) にしたがって WGA ( whole genome amplification) 反応を行った産物について、同様の SNP タイピングを試みた。

(倫理面への配慮)

(1)について：本実験で用いたヒト腎組織を用いた実験計画については、東京女子医科大学病院ならびに東京大学大学院薬学系研究科に設置された倫理委員会の承認を得ており、あらかじめ同意説明文書により、提供者に説明を行った後、書面による同意が得られた患者より手術で摘出した腎臓の一部を実験に供している。

(4)について：(倫理面への配慮)；臨床試験は臨床試験専門の医療施設に依頼して行った。被検者のプライバシーの確保とともに

に、保険制度、経済的な支援を確保するとともに、実施にあたっては、当該施設の倫理審査委員会、ゲノム審査委員会での審査、承認の後に実施した。遺伝子解析に使用した DNA は連結不可能匿名化された試料であり、本研究の目的等、倫理指針に準拠した説明を行い、書面による承諾を得た後に使用した。さらに、総ての研究は鳥取大学医学部倫理審査委員会、九州大学薬学研究院倫理審査委員会においても、審査・承認を受けた後実施した。

(5)について：本研究は、すでにヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会より承認を得た疾患関連遺伝子多型解析研究に含まれる。また本研究は技術開発研究であり、技術の評価に用いるヒトゲノム試料は、全て公的財団（ヒューマンサイエンス財団）より得た連結不可能匿名化済み試料である。

## C.研究結果

(1) 抗HIV治療薬adefovirの腎毒性発現に関与する輸送担体・代謝酵素の同定

AdefovirのOAT1, OAT3発現細胞における取込みを観察したところ、OAT1発現細胞においてのみ取込みが観察されたことから、adefovirがOAT1の基質となることが示唆された。さらに、ヒト腎スライスを用いてadefovirの取込みに対するp-aminohippurate (PAH; OAT1選択的阻害剤)、benzylpenicillin (PCG; OAT3選択的阻害剤)ならびにprobenecid (OAT1, 3阻害剤)の影響を観察したところ、PAH, probenecidによっては、adefovirの取込みは有意に阻害されたものの、PCGによっては取り込みの阻害が観察されなかったことから、adefovirの腎取込みには、OAT1が主に関与することが示された。次に、腎排泄トランスポーターとしてMRP4ノックアウトマウスを用いたin vivo実験の結果、血中濃度・腎臓中濃度が有意に高いことが示された。さらに、adefovirの毒性発現には、リン酸化されることが必須であることから、adefovirのリン酸化に関わる酵素を同定するため、adenylate kinase (AK)に着目し、AK2, AK3, AK4それぞれを発現するHEK293細胞を構築し、adefovirの濃度依存的な細胞増殖抑制の効果を観察したところ、いずれの細胞においても、adefovirによる増殖抑制が見られた。また、ミトコンドリア内にadefovirならびにリン

酸化体が輸送されるメカニズムを推定するため、dCTPの単離ミトコンドリア画分への輸送を、adefovirはdCTPの輸送を促進し、逆にadefovir2リン酸化体は、dCTPの取込みを阻害した。

(2) 脳および精巣への薬物・外来異物の移行におけるBCRPの関与

BCRPの精巣ならびに精巣上体に染色が確認された。また、BCRPならびにMDR1発現細胞における経細胞輸送を複数の化合物について観察したところ、脂溶性の高い化合物については、MDR1, BCRP両方の良好な基質となり、脂溶性が低くアニオン性を示す化合物については、MDR1よりはBCRPの基質になりやすい傾向があることが示唆された。BCRPノックアウトマウスでは、脳および精巣への分布がBCRPの基質薬物や内分泌かく乱物質・植物エストロゲンなど複数の化合物で上昇が観察された。

(3) 肝血管側膜上に存在するMRP3, MRP4が薬物の体内動態に与える影響に関する検討

潰瘍性大腸炎の薬物であるE3040のグルクロン酸抱合体や、抗がん剤であるCPT-11の活性本体であるSN-38およびそのグルクロン酸抱合体、methotrexateについて、MRP3ノックアウトマウスにおいて有意な血中濃度の低下が見られたことから、肝臓の血管側において、MRP3が血中へのbackfluxに関与していることが示された。一方、OATP1B1/MRP2/MRP3を同時発現するトリプルトランスフェクタントを構築して、経細胞輸送を観察し、OATP1B1/MRP2共発現系と比較したところ、先にMRP3ノックアウトマウスにおいて、体内動態に差が見られた化合物については、basalからapical側への経細胞輸送が有意に低下することが明らかとなり、in vitro実験系で見られた経細胞輸送低下の割合が大きいほど、in vivoにおける血中濃度の上昇割合も大きいことが示された。

(4) 薬効・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の推定のための臨床研究

4-1 BCRP Q141K の遺伝子多型とpitavastatinならびにpitavastatin lactoneの薬物動態との間には、関連がみいだせなかった。一方で、SLCO1B1\*15 変異の保有者では、acid体のAUCが高値を示すことが示されたが、lactone体では、有意な差が認められなかった。

4-2 HbA1cを主な指標とし、メトホルミンに耐性と感受性を示す患者33名を対象とし、OCT1, OCT2 遺伝子多型やその他の要因を考慮したケースコントロールスタディを実施した。その結果、年齢、BMI、高脂血症治療薬の処方の有無、OCT1 遺伝子の408Met>Valが両群を判別する正の要因として選択された。ヒト肝を用い、408Met>ValのOCT1 mRNA発現量への関与を検討した結果、有意ではないが、408Val群で発現量が高い傾向が見られた。

(5) 薬物代謝・トランスポーター遺伝子のSNP解析キットの開発

マルチプレックスPCR増幅に失敗したものが96箇所of SNP中3箇所、遺伝子型クラスター分離の悪かったものが2箇所を除く91箇所of SNPにおいてコール率は99.9%以上、ダイレクトシーケンシングによる遺伝子型との一致率は100%となり、2回の独立した実験から得られた再現性はR二乗値で0.98であった。すなわち、DigiTag2法は9割を越える高い成功率(conversion rate)を達成し、高い精度と再現性を持つ有用なSNPタイピング技術であることがわかった。

また、48検体のWGA産物を試料としてもタイピングが可能であることが示された。

## D. 考察

(1) 抗HIV治療薬adefovirの腎毒性発現に関与する輸送担体・代謝酵素の同定

Adefovirは、比較的高頻度に腎毒性を発現することが知られている薬物であり、メインの消失機構は腎排泄であることから、腎臓での輸送メカニズムは、毒性を決定する1つの要因になりうる。そこで、トランスポーターに関して検討を行ったところ、腎取込みには、主にOAT1が関与し、排泄にはMRP4が一部関与することが示唆される結果を得た。また、ミトコンドリアでの毒性発現には、adefovirのリン酸化が必須であることが知られており、今回の研究から、adenylate kinase 2,3,4が役割を担っていることが明らかとなった。今後、これら分子の毒性発現における相対的な寄与の大きさを定量的に明らかにしていく必要があると考えている。また、ミトコンドリアへのdCTPの輸送に対して、adefovirならびにそのリン酸化体が影響を与えたことから、adefovirやリン酸化体についても、ミトコンドリアへの取込みに関わる何らかの輸送担体の存

在が示唆され、今後この同定が毒性の理解につながると考えられる。

#### (2) 脳および精巣への薬物・外来異物の移行におけるBCRPの関与

BCRP は、脳だけでなく精巣にも発現が認められることが明らかとなった。また、基質として、多くの薬物や植物エストロゲン・内分泌かく乱物質などが受け入れられることが明らかとなった。また、BCRP の基質の一部は、MDR1 の基質ともオーバーラップが認められており、両方の基質となるような化合物については、BCRP ノックアウトマウスにおいて脳・精巣移行の上昇幅が比較的小さいのに対して、MDR1 よりBCRP に対して良好な基質は、物性として、アニオン性で比較的水溶性が高く、BCRP ノックアウトマウスで、脳・精巣移行の上昇が大きいことが示された。このことは、脂溶性が高い基質については、脳や精巣からの排出にMDR1 が主に寄与しており、脂溶性の低い化合物については、BCRP が排出に寄与するような物性による別の機構を生体が用意することで、あらゆる生体異物に対応するためのシステムが備わっていることが想定される。特に、植物エストロゲンや内分泌かく乱物質などは、生殖毒性を有することが知られており、今後、BCRP の機能変化と毒性への影響について更なる検討を行う必要があると考えている。

#### (3) 肝血管側膜上に存在するMRP3, MRP4が薬物の体内動態に与える影響に関する検討

今回の検討から、MRP3 が肝血管側膜上において、肝臓内から血管側へのbackfluxに関与することが、ノックアウトマウスを用いた検討から示されており、さらに、*in vitro* 実験により、共発現系にさらにMRP3 を発現させた細胞株を構築することで、経細胞輸送を観察することで、容易にMRP3 の関与を明らかにできる実験系を構築することができた。MRP3 については、転写効率を変化させる5'上流域の遺伝子変異が報告されており、今後臨床研究を通して、基質薬物の体内動態にどの程度影響を与えるのか、調べていく必要があると考えている。一方、MRP4 については、今回の検討では、ノックアウト動物において薬物動態が変化する薬物を見出すことはできなかった。よって、肝臓においては、MRP3 の方が重要であることが想定された。

#### (4) 薬効・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の推定のための臨床研究

4-1 SLCO1B1\*15 allele の存在で有意に高い血中濃度推移が活性型であるacid体に認められた。一方、lactone体には遺伝子型による体内動態の差は観察されなかったが、acid体と同程度の血中濃度推移が見られた。pitavastatinを始めとするHMGCoA還元酵素阻害剤では、acid体とlactone体が肝を中心にinterconversionすることが知られており、今後、この影響についても考察をする必要がある。

4-2 メトホルミンの血糖降下作用に408Met>Valの関与が示唆された。日本人では、Metが野生型であり、肝での発現量が低下する傾向にあることから、効果の減弱との関連が予想されるが、さらに検証が必要である。

#### (5) 薬物代謝・トランスポーター遺伝子のSNP解析キットの開発

DigiTag2法は、各SNPの遺伝子型をEDおよびD1の組み合わせに変換するエンコードのステップの前に、解析対象となるSNPを含む断片をマルチプレックスPCRにより増幅する。解析対象断片だけを切り出して増幅するため、他のゲノム領域に相同性の高い領域が存在する場合でも正確なタイピングを行うことが可能となる。また、エンコードステップではミスマッチを導入したプローブを使用することにより、高い成功率で遺伝子型クラスターを分離できることが確認された。さらに物理・化学的性質が一樣となるように設計されたEDおよびD1を使用することにより、SNPタイピングを正確にかつ高い再現性で行えることが明らかとなった。また、WGA産物を試料としたSNPタイピングも可能であることから、わずかな量のゲノムDNAからでも解析を行うことができる。これらの特徴は本手法が安価な遺伝情報解析のプラットフォームとなることを示している。現在、薬剤応答性遺伝子多型解析キットの作成に向けて、候補SNPを選出し、特異的プローブ、プライマーの設計まで終えている。

#### E. 結論

以上の検討より、adefovirの腎毒性を決定する要因として、OAT1, MRP4が関与することが示唆されるとともに、リン酸化を司るAK2, 3, 4や、ミトコンドリア内にadefovirならびにリン酸化体を輸送するトランスポーターなどの機能があげられることが示唆

された。多くの薬物・化合物の脳内および  
精巣内移行に BCRP が関与することを示し、  
BCRP が薬物の精神神経毒性ならびに生殖  
毒性を決める一要因になりうることを示唆  
した。さらには、MRP3 が、肝臓における  
血管側への backflux に寄与して、薬物動態  
に影響を与えることを明らかにするととも  
に、その効果を in vitro 実験系で明らかにす  
る方法論を構築することができた。

OATP1B1 によるスタチンの輸送には、  
\*15 allele の存在が重要である。一部の高血  
糖治療薬の個人差にも OCT1 の遺伝子多型  
の関与が疑われる。

前年度に開発した SNP タイピング技術を  
さらに改良し、簡便化、低コスト化を実現  
した DigiTag2 法を確立した。この技術によ  
り、高い成功率、コール率、精度、再現性  
を達成した。

#### F.健康危険情報 なし

#### G.研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hirano, M., Maeda, K., Shitara, Y. and Sugiyama, Y. Drug-drug interaction between pitavastatin and various drugs via OATP1B1. *Drug Metab Dispos* 34: 1229-36 (2006)
- 2) Ishiguro, N., Maeda, K., Kishimoto, W., Saito, A., Harada, A., Ebner, T., Roth, W., Igarashi, T. and Sugiyama, Y. Predominant contribution of OATP1B3 to the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Drug Metab Dispos* 34: 1109-15 (2006)
- 3) Mita, S., Suzuki, H., Akita, H., Hayashi, H., Onuki, R., Hofmann, A.F. and Sugiyama, Y. Inhibition of bile acid transport across Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB11)-coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-inducing drugs. *Drug Metab Dispos* 34: 1575-81 (2006)
- 4) Yamashiro, W., Maeda, K., Hirouchi, M., Adachi, Y., Hu, Z. and Sugiyama, Y. Involvement of transporters in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor, in humans. *Drug Metab Dispos* 34: 1247-54 (2006)
- 5) Kikuchi R., Kusuhashi H., Hattori N., Shiota K., Kim I., Gonzalez F.J. and Sugiyama Y.

Regulation of the Expression of Human Organic Anion Transporter 3 by Hepatocyte Nuclear Factor 1{alpha}/beta and DNA Methylation. *Mol Pharmacol.* 70: 887-96 (2006)

6) Enokizono J., Kusuhashi H. and Sugiyama Y. Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the biliary excretion and intestinal efflux of troglitazone sulfate, the major metabolite of troglitazone with a cholestatic effect. *Drug Metab Dispos.* 35: 209-14 (2007)

7) Shitara, Y., Horie, T. and Sugiyama, Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur J Pharm Sci* 27: 425-446 (2006)

8) Shitara, Y. and Sugiyama, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther* 112: 71-105 (2006)

9) 杉山雄一、前田和哉 第2章「前臨床から臨床試験へのブリッジング」、臨床薬理に基づく医薬品開発戦略、杉山雄一・津谷喜一郎編、廣川書店、pp.15-36 (2006)

10) 家入一郎、薬物動態情報の活用 薬物代謝・第1章 遺伝情報に基づいた薬物応答性の個人差解明と医薬品の適正使用への展開、日本医療薬学会 編、医療薬学フロンティア、薬事日報社、東京、2006、pp. 79-99

11) Takane H et al., Pharmacogenetic determinants of variability in lipid-lowering response to pravastatin therapy, *J Hum Genet*, 51, 822-6 (2006)

12) Ieiri I et al., Genetic polymorphisms of drug transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2, 651-74 (2006)

13) Shikata E et al., Human organic anion transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin, *J Hum Genet*, 52, 117-22 (2007)

14) Nishida N, Tanabe T, Takasu M, Suyama A, and Tokunaga K: Further development of multiplex SNP typing method, DigiTag2 assay. *Anal. Biochem.*, in press (2007)

15) 徳永勝士： 遺伝子・ゲノム多型解析法の進展. 「臨床ゲノム科学入門」永井良三(監) 徳永勝士、山崎力、大木秀一(編)、杏林図書、208-220、2007.

## 2. 学会発表

1) Sugiyama Y, "Development of a database with simulation function for quantitative prediction of enzyme and transporter mediated drug interactions", 5th Measurement and Kinetics of In Vivo Drug Effects, 2006.4, Amsterdam, The Netherlands

2) 松島総一郎、前田和哉、杉山雄一 ヒト胆管側膜に発現する排出トランスポーターに対する選択的阻害剤の探索に関する基礎検討、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都

3) 田迎、前田和哉、杉山雄一 PPAR アゴニストによる肝取込み・排泄トランスポーターに関する検討 - 基質特異性、種差および in vivo における意義 -、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都

4) 山田哲裕、前田和哉、杉山雄一 新規アンジオテンシン II 受容体拮抗薬オルメサルタンの肝輸送過程を決定するトランスポーターの解析、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都

5) 林久允、高田龍平、鈴木洋史、大貫玲子、杉山雄一 胆汁酸トランスポーター BSEP/Bsep の輸送機能に関するヒト、ラット間における種差の検討、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都

6) 渡邊貴夫、楠原洋之、前田和哉、北村嘉章、杉山雄一 薬物トランスポーターを組み込んだ生理学的薬物速度論モデルの構築、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都

7) Sugiyama Y, "Influx and Efflux Transporters in the Blood Brain and Blood-CSF Barriers", The 1st Asia Pacific ISSX Meeting, 2006.5, Jeju, Korea

8) Kitamura S, Maeda K and Sugiyama Y, "Involvement of Transporters in the Hepatic Transport of Rosuvastatin", The 1st Asia Pacific ISSX Meeting, 2006.5, Jeju, Korea

9) Sugiyama Y, "Computational and in vitro Approaches for Predicting Drug Metabolism and Pharmacokinetics in Humans", The 15th World Congress of Pharmacology (IUPHAR2006), 2006.7, Beijing, China

10) Sugiyama Y, "Drug transporters in the new drug discovery and development", The 33rd Annual Meeting of the Controlled Release Society, 2006.7, Vienna, Austria

11) 石黒直樹、前田和哉、五十嵐隆、杉山

雄一 アンジオテンシン II 受容体拮抗薬テルミサルタンおよびグルクロナイドの肝輸送過程を決定するトランスポーターの解析、第33回日本トキシコロジー学会学術年会、2006.7、名古屋

12) 田迎、前田和哉、杉山雄一 PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha/\gamma$  agonist 活性を有する薬物群のトランスポーター阻害能に関する検討と in vivo 胆汁うっ滞との関連、第33回日本トキシコロジー学会学術年会、2006.7、名古屋

13) Sugiyama Y, "Extrapolation and scaling of in vitro data to whole organ PBPK models", EUFAPS Conference, 2006.9, Copenhagen, Denmark

14) Maeda K, Tian Y, Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann AF, and Sugiyama Y, Assessment of inhibitory effect of many therapeutically important drugs on bile acid transport by NTCP, BSEP and other transporters, Falk Symposium "Bile Acids: Biological Actions and Clinical Relevance", 2006.10, Freiburg, Germany

15) Sugiyama Y, "Drug transporters & therapeutic promise: Molecular multiplicity, substrate specificity, drug-drug interaction and genetic polymorphism", The Eighth National Congress on Drug and Xenobiotic Metabolism, 2006.10, Dalian, China

16) Sugiyama Y, "Use of Drug Transportation in the delivery of new drugs: Role in discovery and development", Asia Pacific Drug Delivery Global Summit 2006, 2006.10, Shanghai, China

17) Sugiyama Y, "Assessment of Transport of New Drug Candidates to Predict the optimum ADME properties", 2006 AAPS Annual Meeting and Exposition, 2006.10, San Antonio, USA

18) Ishiguro N, Igarashi T, Maeda K, Ebner T, Roth W and Sugiyama Y, "Investigation of the transporters responsible for the hepatobiliary transport of a novel angiotensin II receptor antagonist, telmisartan and its glucuronide", 14<sup>th</sup> North American ISSX meeting, 2006.10, Puerto Rico, USA

19) Kikuchi R, Kusuhara H, Hattori N, Shiota K, Kim I, Gonzalez FJ and Sugiyama Y, "Regulation of the expression of human organic anion transporter 3 by hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha/\beta$  and DNA methylation", 14<sup>th</sup> North American ISSX meeting, 2006.10, Puerto Rico, USA

20) 榎園淳一、楠原洋之、安達弥永、Schinkel AH, 杉山雄一 BCRP と硫酸基転移酵素の

協奏的な解毒機構、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京

21) 楠原洋之、榎園淳一、今岡知己、Schinkel AH, Schuetz JD, 杉山雄一 生体防御機構における ABC トランスポーター(BCRP と MRP4)の機能解析、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京

22) 渡辺悦郎、楠原洋之、杉山雄一 Organic solute transporter alpha/beta (OST $\alpha$ / $\beta$ )の機能解析、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京

23) 尾瀬淳、楠原洋之、遠藤千尋、杉山雄一 有機アニオンの脳移行過程に対するマウス Oatp1a4 の役割、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京

24) 渡邊貴夫、楠原洋之、前田和哉、杉山雄一 トランスポーターを組み入れた生理学的薬物速度論モデリング、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京

25) 菊地良太、楠原洋之、服部中、塩田邦郎、Kim I, Gonzalez FJ、杉山雄一 Hepatocyte nuclear factor 1 及び DNA メチル化による薬物トランスポーターの発現制御、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京

26) 松島総一郎、前田和哉、杉山雄一 フェキソフェナジンの OATP1B3 を介した肝取込みに対する併用薬物の阻害効果の検討、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京

27) 安藤智広、楠原洋之、Merino G, Schinkel AH, 杉山雄一 マウスを用いたフルオロキノロン胆汁中排泄機構の解明、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京

28) 山田哲裕、前田和哉、杉山雄一 オルメサルタンの肝臓・腎臓における輸送メカニズムに関する検討、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京

29) 石黒直樹、前田和哉、斎藤麻美、Ebner T, Roth W, 杉山雄一 アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、テルミサルタンおよびテルミサルタングルクロン酸抱合体の肝輸送過程を決定するトランスポーターの解析、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京

30) 家入一郎、臨床に役立つ添付文書の科学的な読み方とその活用—相互作用のデータソースを検証する—、医療薬学シンポジウム (シンポジスト)、大阪、2006 年 7 月

31) Nishida N, Tanabe T, Takasu M, Suyama A, and Tokunaga K: DigiTag2 assay for multiplex SNP typing. 56<sup>th</sup> Annual Meeting, The American Society of Human Genetics. P.227, 2006

32) 西田奈央、田邊哲也、高須美和、陶山

明、徳永勝士: DigiTag2 法を用いたマルチプレックス SNP タイピング. 日本人類遺伝学会第 51 回大会, P.141, 2006

33) 西田奈央、田邊哲也、高須美和、陶山明、徳永勝士: DigiTag2 法によるマルチプレックス SNP タイピング. 日本 DNA 多型学会第 15 回学術集会, P.55, 2006

H.知的財産権の出願・登録状況  
特になし

薬物の効果・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の *in vitro* 実験系からの推定と、毒性回避のための *in vitro* スクリーニング系の開発

主任研究者 杉山雄一・東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室・教授

**研究要旨** 本年度は、前年度に続き、多種類のノックアウト動物ならびに *in vitro* 実験系を用いた解析をすすめ、全身循環血を中心とした薬物の体内動態のみならず、血中動態に反映されないような局所への薬物の集積による薬効・毒性をも加味した以下の解析を進めた。(1) 腎毒性を引き起こす抗 HIV 治療薬 adefovir の腎への集積について調べた結果、OAT1, MRP4 の輸送への関与を明らかにした。さらに毒性発現に重要なリン酸化を引き起こす酵素群が主に adenylate kinase 2,4 であることを示唆する結果を得た。(2) 精神神経系や生殖系の毒性メカニズムの解明へ向けて、BCRP (breast cancer resistance protein) が精巣・精巣上体に発現することを示し、Bcrp ノックアウト動物を通じた解析から、種々のエストロゲン様の作用を有する内分泌かく乱物質や種々の基質薬物について、脳や精巣への移行制御に BCRP が関与することを明確にした。(3) Mrp3 ノックアウト動物を用いて、methotrexate など種々の薬物の体内動態が変化することを示すとともに、Mrp3, 4 の個々の薬物の体内動態への重要性を簡便に評価する *in vitro* マルチ発現系 (OATP1B1/MRP2/MRP3 or MRP4) の構築に成功した。

#### A. 研究目的

薬物の毒性発現の決定要因のひとつに、薬物動態学的な側面が挙げられる。従って、薬物が、副作用臓器に集積したり、何らかの原因で、消失機構が阻害されたりするなどして、血中濃度が予期せぬ上昇をすることによる副作用が考えられる。これらを推定するためには、汎用されている薬物が、どのような分子により薬物動態が制御されており、それらの相対的な重要性を決めることが重要であると考えられる。さらに毒性発現には、毒性を引き起こす活性本体を作り出す代謝酵素の機能も影響を与えうる。本研究では、*in vitro* 実験系ならびに各種トランスポーター遺伝子ノックアウトマウスなどを用いて、薬物動態・薬効・副作用に関与する複数の分子を同定しうるスクリーニング系の開発ならびにそれらを用いた臨床で使用されている薬剤の評価を試みた。

#### B. 研究方法

(1) 抗 HIV 治療薬 adefovir の腎毒性発現に関与する輸送担体・代謝酵素の同定

腎取込みトランスポーター OAT1, OAT3

発現 HEK293 細胞を用いて、adefovir の取り込み能力を測定した。併せて、書面にて informed consent がとられたヒトから手術によって摘出された腎臓サンプルのうち、病変のない正常部を用いてヒト腎スライスを調製し、薬物と一定時間 incubation することで、腎臓への経時的な取り込みを観察した。腎排泄側トランスポーターの解析については、MRP4 に焦点をあて、MRP4 発現膜ベシクルを用いた ATP 依存的な取込みを観察した。さらに、MRP4 ノックアウトマウスと野生型マウスを用いて、adefovir を一定時間 infusion し、定常状態における血中濃度ならびに腎臓内濃度を比較した。

次に、adefovir の毒性発現のために必須であるリン酸化に関与する酵素群を同定する目的で、adenylate kinase (AK) 2, 3, 4 を発現する HEK293 細胞を作製し、MTT assay により、adefovir の濃度依存的な細胞増殖について検討を行った。さらに、ミトコンドリアへの adefovir の取り込み機構を明らかにするために、HEK293 細胞よりミトコンドリア画分を調製し、一定時間ミトコンドリアと [<sup>3</sup>H]dCTP を incubation した後、迅速ろ過法によりミトコンドリアを分離することで、ミ

トコンドリアへのdCTPの取込みを観察し、adefovirならびにadefovirの2リン酸化体との共存による取込みへの影響について観察した。

(2) 脳および精巣への薬物・外来異物の移行におけるBCRPの関与

BCRPの精巣における発現については、抗BCRP抗体を用いて組織染色を行った。また、BCRP発現MDCKII細胞ならびにMdr1a発現LLC-PK1細胞をtranswell上に播種し、basalおよびapical方向への経細胞輸送を観察することで、MDR1とBCRPの経細胞輸送への影響について観察した。また、BCRPノックアウトマウスと野生型マウスに各化合物をinfusionすることで、定常状態における脳および精巣対血漿中濃度比を算出し比較を行った。

(3) 肝血管側膜上に存在するMRP3, MRP4が薬物の体内動態に与える影響に関する検討

MRP3, MRP4それぞれのノックアウトマウスおよび野生型マウスを用いて、薬物を静脈内投与後の血中濃度推移の違いを観察した。さらに、MRP3, MRP4の機能をin vitro実験における経細胞輸送の変化でとらえることのできる新規実験系であるトリプルトランスフェクタントを構築した。本発現系は、ヒトOATP1B1/MRP2共発現系に、MRP3, MRP4それぞれを発現できるアデノウィルスを感染させることで、3つのトランスポーターを同時に極性細胞であるMDCKII細胞に発現させた発現細胞である。これをtranswell上に播種し、共発現系におけるbasalからapical方向への薬物の輸送と比較することで、MRP3, MRP4の経細胞輸送に与える影響について考察を行い、in vivoノックアウトマウスから得られた結果との比較を試みた。

(倫理面への配慮)

本実験で用いたヒト腎組織を用いた実験計画については、東京女子医科大学病院ならびに東京大学大学院薬学系研究科に設置された倫理委員会の承認を得ており、あらかじめ同意説明文書により、提供者に説明を行った後、書面による同意が得られた患者より手術で摘出した腎臓の一部を実験に供している。

## C.研究結果

(1) 抗HIV治療薬adefovirの腎毒性発現に関与する輸送担体・代謝酵素の同定

Adefovirの腎取込み機構を明らかにするため、有機アニオントランスポーターであるOAT1, OAT3発現細胞における取込みを観察したところ、OAT1発現細胞においてのみ、トランスポーター非発現の対照細胞と比較して、有意に大きな取込みが観察されたことから、adefovirがOAT1の基質となることが示唆された。さらに、ヒト腎スライスを用いてadefovirの取込みに対するp-aminohippurate (PAH; OAT1選択的阻害剤)、benzylpenicillin (PCG; OAT3選択的阻害剤)ならびにprobenecid (OAT1, 3阻害剤)の影響を観察したところ、PAH, probenecidによっては、adefovirの取込みは有意に阻害されたものの、PCGによっては取り込みの阻害が観察されなかったことから、adefovirの腎取込みには、OAT1が主に関与することが示された。次に、腎排泄トランスポーターとしてMRP4に着目し、MRP4ノックアウトマウスを用いたin vivo実験を行ったところ、野生型マウスと比較して、血中濃度が有意に高い値を示し、腎臓内濃度も高いことが示された。これらから、MRP4がadefovirの腎臓から尿中への排出トランスポーターとして機能していることが示された。さらに、adefovirの毒性発現には、リン酸化されることが必須であることが報告されているが、それに関与する酵素群は明らかとはされていなかった。そこで、adefovirのリン酸化に関わる酵素を同定するため、adenylate kinase (AK)に着目し、AK2, AK3, AK4それぞれを発現するHEK293細胞を構築し、adefovirの濃度依存的な細胞増殖抑制の効果を観察したところ、いずれの細胞においても、adefovirによる増殖抑制が観察されており、特にAK2発現細胞においては、対照細胞と比較して1000倍近く低い濃度で、増殖抑制が強く観察された。さらに、それらの発現細胞において、adefovirの1, 2リン酸化体の割合が増加したことから、リン酸化の促進が起こっていることが確認された。さらに、ミトコンドリア内にadefovirならびにリン酸化体が輸送されるメカニズムを推定するため、dCTPの単離ミトコンドリア画分への輸送に対するadefovirおよびそのリン酸化体の影響について観察したところ、adefovirは、dCTPの輸送を促進し、逆に

adefovir2リン酸化体は、dCTPの取込みを阻害するという結果を得たことから、何らかの輸送担体がこれらの輸送に関与する可能性が間接的に示唆された。

## (2) 脳および精巣への薬物・外来異物の移行におけるBCRPの関与

BCRPの精巣における発現を観察したところ、精巣ならびに精巣上体に染色が確認された。また、BCRPならびにMDR1発現細胞における経細胞輸送を複数の化合物について観察したところ、比較的脂溶性の高い化合物については、MDR1、BCRP両方の良好な基質となることが観察された一方で、脂溶性が低く、アニオン性を示す化合物については、MDR1よりはBCRPの基質になりやすい傾向があることが示唆された。さらに、BCRPノックアウトマウスを用いて、野生型マウスと比較して、脳および精巣への分布について、BCRP基質となる薬物や内分泌かく乱物質・植物エストロゲンなど複数の化合物で上昇が観察された。また、*in vitro*の結果と比較すると、MDR1、BCRP両方に良好な基質となる化合物については、その上昇割合は低かったものの、BCRPに対して良好な基質となる群については、BCRPノックアウトマウスにおいても、脳および精巣における組織内濃度の上昇割合が比較的大きいことが示唆される結果を得た。

## (3) 肝血管側膜上に存在するMRP3、MRP4が薬物の体内動態に与える影響に関する検討

MRP3、MRP4が薬物およびその抱合代謝物の薬物動態に影響を与えるかどうかについて検討するために、MRP3およびMRP4ノックアウトマウスを用いて野生型マウスと比較して体内動態に関する検討を行ったところ、潰瘍性大腸炎の薬物であるE3040のグルクロン酸抱合体や、抗がん剤であるCPT-11の活性本体であるSN-38およびそのグルクロン酸抱合体、methotrexateについて、MRP3ノックアウトマウスにおいて有意な血中濃度の低下が見られたことから、肝臓の血管側においてMRP3が血中へのbackfluxに関与していることが示された。一方、OATP1B1/MRP2/MRP3を同時発現するトリプルトランスフェクタントを構築して、経細胞輸送を観察し、OATP1B1/MRP2共発現系と比較したところ、先にMRP3ノックアウトマウスにおいて、体内動態に差が見

られた化合物については、basalからapical側への経細胞輸送が有意に低下することが明らかとなり、MRP3が細胞内の基質をbasal側にbackfluxすることにより、経細胞輸送を抑制する方向に機能していることが明らかとなるとともに、*in vitro*実験系で見られた経細胞輸送低下の割合が大きいほど、*in vivo*における血中濃度の上昇割合も大きいことが示された。

## D. 考察

### (1) 抗HIV治療薬adefovirの腎毒性発現に関与する輸送担体・代謝酵素の同定

Adefovirは、比較的高頻度に腎毒性を発現することが知られている薬物であり、そのメカニズムとして、DNA polymerase  $\gamma$ の阻害によるミトコンドリアでのDNA合成の阻害が主原因であるとされてきた。しかしながら、毒性は、腎臓への移行やミトコンドリアへの移行により薬物の局所の濃度が上昇することで、濃度対効果の関係に従い、DNA合成が抑制されると考えられること、さらには、adefovirのメインの消失は腎排泄であることから、腎臓への移行メカニズムは、毒性を決定する1つの要因になりうる。また、adefovirの水溶性や電荷などの物性から考えて、容易に膜を受動輸送により透過するとは考えにくく、膜透過には一連のトランスポーターを介していることが示唆された。そこで、トランスポーターに関して検討を行ったところ、腎取込みには、主にOAT1が関与し、排泄にはMRP4が一部関与することが示唆される結果を得た。OAT1は、有機アニオンでも分子量が比較的小さめの化合物を認識することから、核酸アナログであるadefovirが基質となることもreasonableであるといえる。また、排泄側については、Mrp4が一部関与することが明らかとなった。他にも、ceftizoximeなどについても、腎排泄にMrp4の関与が認められており、今後、複数の薬物動態において、Mrp4の関与が明らかになることが期待される。また、ミトコンドリアでの毒性発現には、adefovirのリン酸化が必須であることが知られており、今回の研究から、adenylate kinase 2,3,4が役割を担っていることが明らかとなった。今後、これらの相対的な役割の大きさの比較や、どこでリン酸化（ミトコンドリア内？外？）されたものが毒性に関与するのかなど定量的に明らかにしてい

く必要があると考えている。また、ミトコンドリアへの dCTP の輸送に対して、adefovir ならびにそのリン酸化体が影響を与えている。仮説としては、adefovir の輸送促進効果については、adefovir の輸送担体を介してミトコンドリア内に移動した後、リン酸化されて、dCTP と交換輸送されることで、説明可能であり、また、adefovir の 2 リン酸化体による輸送阻害は、dCTP と同じ輸送担体を介して輸送されている可能性が示唆される。ミトコンドリアには、過去、核酸の輸送に関与するトランスポーター群が知られており、今後、これらの同定も含めて、毒性メカニズムの定量的なモデル解析が必要であると考えている。

## (2) 脳および精巣への薬物・外来異物の移行におけるBCRPの関与

今回の検討の結果、BCRP は、脳だけでなく、精巣にも発現が認められることが明らかとなった。また、基質として、多くの薬物や植物エストロゲン・内分泌かく乱物質などが受け入れられることが明らかとなった。また、BCRP の基質の一部は、MDR1 の基質ともオーバーラップが認められており、両方の基質となるような化合物については、BCRP ノックアウトマウスにおいて、野生型マウスと比較したときの脳・精巣移行の上昇幅が比較的小さいのに対して、MDR1 より BCRP に対して良好な基質は、物性として、アニオン性で比較的水溶性が高いことが明らかとなり、また、BCRP ノックアウトマウスで、脳・精巣移行の上昇が大きいことが示された。このことは、脂溶性が高い基質については、脳や精巣からの排出に MDR1 が主に寄与しており、脂溶性の低い化合物については、BCRP が排出に寄与するような物性による別の機構を生体が用意することで、あらゆる生体異物に対応するためのシステムが備わっていることが想定される。また、BCRP については、Q141K というアミノ酸変化を伴い、発現量が低下することが知られている遺伝子多型がかなり高頻度（アレル頻度で、日本人で 35%程度）に認められる。従って、ホモで変異を有する人は、10 人に 1 人程度存在することから、BCRP の遺伝子多型による、今回対象とした薬物や化合物の脳・精巣移行が変化する可能性が大いに考えられる。特に、植物エストロゲンや内分泌かく乱物質などは、生殖毒性を有することが知られ

ており、今後、BCRP の機能変化と毒性への影響について更なる検討を行う必要があると考えている。

## (3) 肝血管側膜上に存在する MRP3, MRP4 が薬物の体内動態に与える影響に関する検討

今回の検討から、MRP3 が肝血管側膜上において、肝臓内から血管側への backflux に関与することが、ノックアウトマウスを用いた検討から示されており、さらに、*in vitro* 実験により、共発現系にさらに MRP3 を発現させた細胞株を構築することで、経細胞輸送を観察することで、容易に MRP3 の関与を明らかにできる実験系を構築することができた。MRP3 は、もともとラットにおいては、平常時には発現が認められない程度に低いですが、胆汁うっ滞など病態時において発現量が上がることが知られていた。しかしながらマウスやヒトにおいては、平常時においても比較的発現が認められることが最近明らかとなり、平常時における肝臓での機能が注目されていた。今回の検討では、MRP3 が、主にグルクロン酸抱合体の排出輸送に寄与するケースが発見されたとともに、methotrexate のような非抱合体の化合物であっても、MRP3 の機能が薬物動態に影響を与える例を明らかにすることができた。MRP3 については、転写効率を変化させる 5' 上流域の遺伝子変異が報告されており、今後臨床研究を通して、基質薬物の体内動態にどの程度影響を与えるのか、調べていく必要があると考えている。一方、MRP4 については、今回の検討では、ノックアウト動物において薬物動態が変化する薬物を見出すことはできなかった。しかし、前述のように、腎排泄型の薬物については、MRP4 が重要な役割を果たす薬物は報告されていることから、臓器によってその重要性は異なることが示唆される。今後、MRP3, MRP4 についても、*in vitro* 実験の結果から、より定量的に寄与率を算出する方法論を構築していきたいと考えている。

## E. 結論

以上の検討より、adefovir の腎毒性を決定する要因として、その動態を制御するトランスポーターである OAT1, MRP4 が関与することが示唆されるとともに、リン酸化を司る AK2, 3, 4 や、ミトコンドリア内に adefovir ならびにリン酸化体を輸送するト

ランスポーターなどの機能が上げられることが示唆された。多くの薬物・化合物の脳内および精巣内移行に BCRP が関与することを示し、BCRP が薬物の精神神経毒性ならびに生殖毒性を決める一要因になりうることを示唆した。さらには、MRP3 が、肝臓における血管側への backflux に寄与して、薬物動態に影響を与えることを明らかにするとともに、その効果を *in vitro* 実験系で明らかにする方法論を構築することができた。

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hirano, M., Maeda, K., Shitara, Y. and Sugiyama, Y. Drug-drug interaction between pitavastatin and various drugs via OATP1B1. *Drug Metab Dispos* 34: 1229-36 (2006)
- 2) Ishiguro, N., Maeda, K., Kishimoto, W., Saito, A., Harada, A., Ebner, T., Roth, W., Igarashi, T. and Sugiyama, Y. Predominant contribution of OATP1B3 to the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Drug Metab Dispos* 34: 1109-15 (2006)
- 3) Mita, S., Suzuki, H., Akita, H., Hayashi, H., Onuki, R., Hofmann, A.F. and Sugiyama, Y. Inhibition of bile acid transport across Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB11)-coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-inducing drugs. *Drug Metab Dispos* 34: 1575-81 (2006)
- 4) Yamashiro, W., Maeda, K., Hirouchi, M., Adachi, Y., Hu, Z. and Sugiyama, Y. Involvement of transporters in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor, in humans. *Drug Metab Dispos* 34: 1247-54 (2006)
- 5) Kikuchi R., Kusuhara H., Hattori N., Shiota K., Kim I., Gonzalez F.J. and Sugiyama Y. Regulation of the Expression of Human Organic Anion Transporter 3 by Hepatocyte Nuclear Factor 1 $\alpha$ /beta and DNA Methylation. *Mol Pharmacol.* 70: 887-96 (2006)
- 6) Enokizono J., Kusuhara H. and Sugiyama Y. Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the biliary excretion and

intestinal efflux of troglitazone sulfate, the major metabolite of troglitazone with a cholestatic effect. *Drug Metab Dispos.* 35: 209-14 (2007)

7) Shitara, Y., Horie, T. and Sugiyama, Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur J Pharm Sci* 27: 425-446 (2006)

8) Shitara, Y. and Sugiyama, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther* 112: 71-105 (2006)

9) 杉山雄一、前田和哉 第2章「前臨床から臨床試験へのブリッジング」、臨床薬理に基づく医薬品開発戦略、杉山雄一・津谷喜一郎編、廣川書店、pp.15-36 (2006)

### 2. 学会発表

- 1) Sugiyama Y, "Development of a database with simulation function for quantitative prediction of enzyme and transporter mediated drug interactions", 5th Measurement and Kinetics of In Vivo Drug Effects, 2006.4, Amsterdam, The Netherlands
- 2) 松島総一郎、前田和哉、杉山雄一 ヒト胆管側膜に発現する排出トランスポーターに対する選択的阻害剤の探索に関する基礎検討、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都
- 3) 田迎、前田和哉、杉山雄一 PPAR $\alpha$ アゴニストによる肝取込み・排泄トランスポーターに関する検討 - 基質特異性、種差および *in vivo* における意義 -、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都
- 4) 山田哲裕、前田和哉、杉山雄一 新規アンジオテンシンII受容体拮抗薬オルメサルタンの肝輸送過程を決定するトランスポーターの解析、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都
- 5) 林久允、高田龍平、鈴木洋史、大貫玲子、杉山雄一 胆汁酸トランスポーター BSEP/Bsep の輸送機能に関するヒト、ラット間における種差の検討、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都
- 6) 渡邊貴夫、楠原洋之、前田和哉、北村嘉章、杉山雄一 薬物トランスポーターを組み込んだ生理学的薬物速度論モデルの構築、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都

- 7) Sugiyama Y, "Influx and Efflux Transporters in the Blood Brain and Blood-CSF Barriers", The 1st Asia Pacific ISSX Meeting, 2006.5, Jeju, Korea
- 8) Kitamura S, Maeda K and Sugiyama Y, "Involvement of Transporters in the Hepatic Transport of Rosuvastatin", The 1st Asia Pacific ISSX Meeting, 2006.5, Jeju, Korea
- 9) Sugiyama Y, "Computational and in vitro Approaches for Predicting Drug Metabolism and Pharmacokinetics in Humans", The 15th World Congress of Pharmacology (IUPHAR2006), 2006.7, Beijing, China
- 10) Sugiyama Y, "Drug transporters in the new drug discovery and development", The 33rd Annual Meeting of the Controlled Release Society, 2006.7, Vienna, Austria
- 11) 石黒直樹、前田和哉、五十嵐隆、杉山雄一 アンジオテンシン II 受容体拮抗薬テルミサルタンおよびグルクロナイドの肝輸送過程を決定するトランスポーターの解析、第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会、2006.7、名古屋
- 12) 田迎、前田和哉、杉山雄一 PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha/\gamma$  agonist 活性を有する薬物群のトランスポーター阻害能に関する検討と in vivo 胆汁うっ滞との関連、第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会、2006.7、名古屋
- 13) Sugiyama Y, "Extrapolation and scaling of in vitro data to whole organ PBPK models", EUFEPS Conference, 2006.9, Copenhagen, Denmark
- 14) Maeda K, Tian Y, Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann AF, and Sugiyama Y, Assessment of inhibitory effect of many therapeutically important drugs on bile acid transport by NTCP, BSEP and other transporters, Falk Symposium "Bile Acids: Biological Actions and Clinical Relevance", 2006.10, Freiburg, Germany
- 15) Sugiyama Y, "Drug transporters & therapeutic promise: Molecular multiplicity, substrate specificity, drug-drug interaction and genetic polymorphism", The Eighth National Congress on Drug and Xenobiotic Metabolism, 2006.10, Dalian, China
- 16) Sugiyama Y, "Use of Drug Transportation in the delivery of new drugs: Role in discovery and development", Asia Pacific Drug Delivery Global Summit 2006, 2006.10, Shanghai, China
- 17) Sugiyama Y, "Assessment of Transport of New Drug Candidates to Predict the optimum ADME properties", 2006 AAPS Annual Meeting and Exposition, 2006.10, San Antonio, USA
- 18) Ishiguro N, Igarashi T, Maeda K, Ebner T, Roth W and Sugiyama Y, "Investigation of the transporters responsible for the hepatobiliary transport of a novel angiotensin II receptor antagonist, telmisartan and its glucuronide", 14<sup>th</sup> North American ISSX meeting, 2006.10, Puerto Rico, USA
- 19) Kikuchi R, Kusuhara H, Hattori N, Shiota K, Kim I, Gonzalez FJ and Sugiyama Y, "Regulation of the expression of human organic anion transporter 3 by hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha/\beta$  and DNA methylation", 14<sup>th</sup> North American ISSX meeting, 2006.10, Puerto Rico, USA
- 20) 榎園淳一、楠原洋之、安達弥永、Schinkel AH, 杉山雄一 BCRP と硫酸基転移酵素の協奏的な解毒機構、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- 21) 楠原洋之、榎園淳一、今岡知己、Schinkel AH、Schuetz JD、杉山雄一 生体防御機構における ABC トランスポーター (BCRP と MRP4) の機能解析、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- 22) 渡辺悦郎、楠原洋之、杉山雄一 Organic solute transporter alpha/beta (OST $\square/\square$ ) の機能解析、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- 23) 尾瀬淳、楠原洋之、遠藤千尋、杉山雄一 有機アニオンの脳移行過程に対するマウス Oatp1a4 の役割、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- 24) 渡邊貴夫、楠原洋之、前田和哉、杉山雄一 トランスポーターを組み入れた生理学的薬物速度論モデリング、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- 25) 菊地良太、楠原洋之、服部中、塩田邦郎、Kim I, Gonzalez FJ, 杉山雄一 Hepatocyte nuclear factor 1 及び DNA メチル化による薬物トランスポーターの発現制御、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- 26) 松島総一郎、前田和哉、杉山雄一 フェキソフェナジンの OATP1B3 を介した肝取込みに対する併用薬物の阻害効果の検討、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- 27) 安藤智広、楠原洋之、Merino G, Schinkel AH, 杉山雄一 マウスを用いたフルオロキノロン胆汁中排泄機構の解明、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- 28) 山田哲裕、前田和哉、杉山雄一 オルメサルタンの肝臓・腎臓における輸送メカ

ニズムに関する検討、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京

29) 石黒直樹、前田和哉、斎藤麻美、EbnerT, Roth W, 杉山雄一—アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、テルミサルタンおよびテルミサルタングルクロン酸抱合体の肝輸送過程を決定するトランスポーターの解析、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京

#### H.知的財産権の出願・登録状況

特になし

**研究要旨** 本年度は、昨年度に引き続き、BCRP、SLCO1B1 遺伝子多型と pitavastatin の体内動態との関連について、被検者の遺伝子型を十分に確保し拡大に努め、その結果の精度を高めた。BCRP については、421C>A に注目したが、pitavastatin acid, lactone いずれも多型の関与は見られなかった。一方、SLCO1B1 については、\*15 allele の存在で有意に高い血中濃度推移が活性型である acid 体に認められた。一方、lactone 体には遺伝子型による体内動態の差は観察されなかったが、acid 体と同程度の血中濃度推移が見られた。pitavastatin を始めとする HMGCoA 還元酵素阻害剤では、acid 体と lactone 体が interconversion することが知られている。昨年検討では、pravastatin ではあったが、コレステロール低下作用への遺伝子多型の影響は長期投与下では見られなくなり、この背景として interconversion の関与が示唆される。次いで、OCT1 と OCT2 遺伝子多型と糖尿病治療薬で、トランスポーターの機能低下で乳酸アシドーシスが懸念されるメトホルミンの効果との関連を評価した。OCT1 遺伝子に見る 408Met>Val 変異の血糖降下作用への関与が示唆された。

#### A.研究目的

薬物トランスポーター遺伝子多型と基質薬物の体内動態との関連を評価することで、生体中での機能を明らかにし、副作用を含む薬効に見られる大きな個人差の原因を解明し、医薬品開発や適正使用の基盤とする。

#### B.研究方法

(1) OATP-C および BCRP 遺伝子多型で層別した健常成人を対象とした。昨年度より、SLCO1B1 \*15/\*15, BCRP 421A/A の被検者数を拡大した。ボランティアに pitavastatin を単回投与し、体内動態と遺伝子型との関連を評価した。(2) メトホルミンを服用する糖尿病患者を対象とし、HbA1c を指標に感受性、耐性群に層別し、OCT1, OCT2 遺伝子多型と効果との関連について検討を加えた。

(倫理面への配慮); 臨床試験は臨床試験専門の医療施設に依頼して行った。被検者のプライバシーの確保とともに、保険制度、経済的な支援を確保するとともに、実施にあたっては、当該施設の倫理審査委員会、ゲノム審査委員会での審査、承認の後に実施した。遺伝子解析に使用した DNA は連結不可能匿名化された試料であり、本研究の目的等、倫理指針に準拠した説明を行い、書面による承諾を得た後に使用した。さらに、総ての研究は鳥取大学医学部倫理審査

委員会、九州大学薬学研究院倫理審査委員会においても、審査・承認を受けた後実施した。

#### C.研究結果

(1)BCRP 遺伝子多型、421C>A に注目した場合、活性体である acid 体の平均 AUC は、421C/C, 421C/A, 421A/A 群で、81.1, 96.7, 78.2 であり、3 群間で有意な差は見られなかった。一方、SLCO1B1\*15 変異に注目した場合、acid 体の平均 AUC は、\*1b/\*1b, \*1b/\*15, \*15/\*15 群でそれぞれ、81.1, 144.0, 250.0 であり、\*15 allele 保有者で有意に高い血中濃度が得られた。一方、lactone 体の平均 AUC は、154.0, 169.0, 153.0 であり、遺伝子型間での差は無かったが、acid 体と同程度の血中濃度推移を示すことが明らかとなった。BCRP の関与をより詳細に検討する目的で、BCRP knockout mice による動態を検討した。その結果、経口投与後の体内動態には、-/-と+/+ mice で差は見られなかった。(2) HbA1c を主な指標とし、メトホルミンに耐性と感受性を示す患者 33 名を対象とし、OCT1, OCT2 遺伝子多型やその他の要因を考慮したケースコントロールスタディを実施した。その結果、年齢、BMI、高脂血症治療薬の処方の有無、OCT1 遺伝子に見る 408Met>Val が両群を判別する正の要因として選択された。ヒト肝を用い、

408Met>Val の OCT1 mRNA 発現量への関与を検討した結果、有意ではないが、408Val 群で発現量が高い傾向が見られた。

#### D. 考察

(1) -/- と +/+ mice での検討結果では、胆汁排泄挙動に大きな差が見られ、-/- mice で有意に低い結果であった。種差が示唆されるが、ヒトでの腸管での pitavastatin の BCRP の関与は弱いと考えられた。さらに、他の薬物での結果を併せて考察すると、多型の関与には基質特異性が予想される。SLCO1B1\*15 allele の存在で有意に高い血中濃度推移が活性型である acid 体に認められた。一方、lactone 体には遺伝子型による体内動態の差は観察されなかったが、acid 体と同程度の血中濃度推移が見られた。pitavastatin を始めとする HMGCoA 還元酵素阻害剤では、acid 体と lactone 体が肝を中心に interconversion することが知られている。昨年の検討では、pravastatin ではあったが、コレステロール低下作用への遺伝子多型の影響は長期投与下では見られなくなり、この背景として interconversion の関与が示唆される。(2) メトホルミンの血糖降下作用に 408Met>Val の関与が示唆された。日本人では、Met が野生型であり、肝での発現量が低下する傾向にあることから、効果の減弱との関連が予想されるが、さらに検証が必要である。

#### E. 結論

OATP1B1 によるスタチンの輸送には、\*15 allele の存在が重要であるが、長期に見た場合、高脂血症治療には大きな影響は無く、むしろ、横紋筋融解症などの副作用への関与が予想される。一部の高血糖治療薬の個人差にもトランスポーターの関与が疑われる。

#### F. 健康危険情報

特にないが、疾患や医薬品効果の個人差解明に関する知見が得られた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 家入一郎、薬物動態情報の活用 薬物代謝・第1章 遺伝情報に基づいた薬物応答性の個人差解明と医薬品の適正使用への展開、日本医療薬学会 編、医療薬学フロン

ティア、薬事日報社、東京、2006、pp. 79-99

2) Takane H et al., Pharmacogenetic determinants of variability in lipid-lowering response to pravastatin therapy, J Hum Genet, 51, 822-6 (2006)

3) Ieiri I et al., Genetic polymorphisms of drug transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy, Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2, 651-74 (2006)

4) Shikata E et al., Human organic anion transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin, J Hum Genet, 52, 117-22 (2007)

##### 2. 学会発表

1) 家入一郎、臨床に役立つ添付文書の科学的な読み方とその活用—相互作用のデータベースを検証する—、医療薬学シンポジウム(シンポジスト)、大阪、2006年7月など

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

現在までに特許出願、登録はない。

厚生科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業（トキシコゲノミクス研究））

分担研究報告書

薬剤代謝・トランスポーター遺伝子の SNP 解析キットの開発

分担研究者 徳永勝士・東京大学医学系研究科人類遺伝学分野・教授

研究要旨：前年度に開発したマルチプレックス SNP タイピング技術をさらに改良し、磁気ビーズを必要とせず、簡便化、低コスト化を実現した DigiTag2 法を確立した。この技術により、高い成功率（9割以上）、コール率（99%以上）、精度（100%）、再現性（0.98）を達成した。同一の DNA マイクロアレイを用いて異なる SNP セットをタイピングできる柔軟性と経済性を利用して、薬剤応答性遺伝子群の多型を同時並列タイピングするキットを作成できると期待され、現在そのプロトタイプを作成を開始している。

#### A.研究目的

薬剤応答性の個人差には、薬理メカニズムに存在する機能的多型の他、薬剤代謝に関わる遺伝子群および薬剤トランスポーター遺伝子群に存在する機能的 SNP による血中濃度時間推移の個人差が大きく関わっている。これら薬剤応答性遺伝子群の機能的 SNP と各種薬剤への応答性の個人差との関連を明らかにし、医療の場において使いやすい SNP タイピングキットを開発することは、個人化医療の実現のために必要不可欠な要素である。本研究においては、既知および新規の薬剤応答性遺伝子群の機能的 SNP を同時並列的に検査（マルチプレックスタイピング）できる技術を開発し、キットとして実用化することを目指す。本年度は、昨年度までに開発した技術をさらに改良して簡便化、低コスト化した DigiTag2 法の確立を目指した。

#### B.研究方法

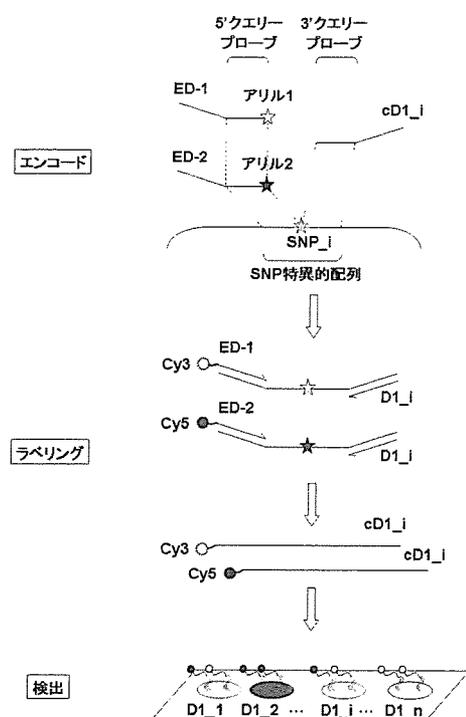
##### DigiTag2法の概要

DigiTag2法は、ターゲット調製、エンコ

ード、ラベリング、検出の4つのステップで構成される（図1参照）。ターゲット分子調製のステップでは試料DNAよりマルチプレックスPCRを行い、解析対象SNPを含むマルチプレックスPCR産物を得る。続いて、エンコードのステップではPCR産物をテンプレートとしたライゲーション反応を行う。エンコード反応では、解析対象SNPごとに2種類の5'クエリープローブと1種類の3'クエリープローブを用意する。5'クエリープローブはSNP部位の5'側と相補的なプローブであり、アリルに対応して2種類のED（ED-1、ED-2）を付加する。また、タイピング精度を上げるために、3'末端に存在するSNP部位から上流4塩基目にミスマッチ塩基を導入した。3'クエリープローブはSNP部位の3'側と相補的なプローブであり、SNPに対応させてD1を付加する。なお、EDおよびD1は物理的、化学的性質が一樣となるように設計した23塩基長のオリゴDNAである。SNP部位において5'クエリープローブ

と3'クエリープローブが隣接してハイブリダイゼーションするとライゲースにより2つのプローブが連結される。続くラベリングのステップでは、蛍光標識EDプライマー (Cy3-ED-1, Cy5-ED-2) とD1プライマー (使用するD1すべてを混合したプライマー) を用いてライゲーション産物をテンプレートとしたPCRを行う。最後に、この蛍光導入PCR産物を、D1に相補的なオリゴDNAを固定したDNAマイクロアレイへハイブリダイゼーションする。

図1 DigiTag2法の概要図



### DigiTag2 法による 96-plex SNP タイピング

まず25 ngのゲノムDNAを用いて、96マルチプレックスPCRを行った。全量10  $\mu$ lの反応溶液 (Multiplex PCR Kit,

QIAGEN) に各SNPに特異的なプライマーペア0.25pmolを加えた。PCRは95  $^{\circ}$ C 15分の熱変性後、95  $^{\circ}$ C 30秒、68  $^{\circ}$ C 6分を1サイクルとして40サイクル行った。次にエンコード反応では、全量30  $\mu$ lのライゲーション反応溶液 (*Taq* DNA ligase, New England BioLabs) に96SNPsに対応する5'クエリープローブと3'クエリープローブを10 fmolずつ加え、マルチプレックスPCR産物を1  $\mu$ lと20 Uの酵素を加えた。ラベリングステップの反応溶液は全量20  $\mu$ lとし、100 fmolのD1プライマー96種類、10 pmolのCy3-ED-1とCy5-ED-2を加え、さらに2.5 Uの酵素

(*ExTaq* polymerase, TaKaRa) を加えた。PCRは95  $^{\circ}$ C 1分の熱変性後、95  $^{\circ}$ C 30秒、55  $^{\circ}$ C 6分、72  $^{\circ}$ C 30秒を1サイクルとして30サイクル行った。最後の検出ステップでは、全量12  $\mu$ lのハイブリダイゼーション溶液 (0.5 $\times$ SSC, 0.1% SDS, 15%ホルムアミド, 1 mM EDTA) に、蛍光導入されたPCR産物5  $\mu$ lを加えた。各サンプルについてハイブリダイゼーション溶液 8  $\mu$ lをDNAマイクロアレイ上の個々のエリアに散布し、90  $^{\circ}$ C 1分の熱変性後、37 $^{\circ}$ Cのハイブリオープンに30分間静置してハイブリダイゼーションを行った。最後にスキャナー

(GenePix4000A, Axon) を用いて読み取り、画像解析ソフト (GenePix Pro4.0, Axon) によりデータ解析を行った。

### WGA 産物を用いた SNP タイピング

まず5 ngのゲノムDNAをテンプレートとして、推奨プロトコル (GenomiPhi DNA amplification kit, Amersham) にしたがってWGA (whole genome amplification) 反応を行った。次に、10倍に希釈したWGA産物をテンプレートとしてマルチプレック