

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19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20(2008)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	21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	28
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	30
-----------------	----

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

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准教授・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・助教
	本橋 秀之	京都大学医学部附属病院薬剤部・助教
	米澤 淳	京都大学医学部附属病院薬剤部・助教

【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。前年度までに、種々薬物トランスポータのプロモーター解析や、H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE) の cDNA クローニングを行い、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) MATE1 並びに MATE2-K の cSNP 解析、(2) 極性細胞を用いたヒト有機カチオン輸送評価系の構築を行ない、またこれまでの基礎研究の成果の臨床応用を目指して、(3) 糖尿病治療薬メトホルミンの臨床薬物動態解析と pharmacogenomics 解析に取り組んだ。

H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE1、MATE2-K) は、最近分子同定されたトランスポータであり、rSNP のみならずアミノ酸変異を伴う cSNP に関する情報も乏しい。そこで、両トランスポータの cSNP の頻度解析や輸送機能に及ぼす影響について調べた。その結果、輸送活性が有意に低下する cSNP が MATE1 遺伝子で 5 種類、MATE2-K 遺伝子で 2 種類同定された。特に、MATE1 G64D と MATE2-K G211V のアミノ酸変異体は、完全に輸送活性が消失した。

ヒトにおけるカチオン性薬物の経細胞輸送を適切に評価するために、ヒトの OCT1/MATE1 (肝臓) 並びに OCT2/MATE1 (腎臓) の double transfectants を作製した。その結果、作製した double transfectants の有用性が示されると共に、従来の取り込み実験では解析が困難であったキニジンの経細胞輸送機構を初めて明らかにすることができた。

糖尿病治療薬メトホルミンは未変化体として尿中排泄され、その尿細管分泌には OCT2 や MATE1、MATE2-K の関与していることを既に我々は明らかにしている。そこで、主に本研究で同定されたこれらトランスポータ遺伝子多型がメトホルミンの消失半減期に及ぼす影響を調べた (N=16)。その結果、現在のところこれらトランスポータの cSNP や rSNP との有意な相関は認められていないが、消失半減期の短い患者において、OCT2 遺伝子のイントロン 1-3 に SNPs が高頻度に認められた。

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、肝有機アニオントランスポータ (OATP1B1) や有機カチオントランスポータ (OCT1) など一部のトランスポータに限られているのが現状である。むしろ、申請者等の臨床研究を中心にして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、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。

発現量を規定するゲノム側の因子としては、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、副作用が起こ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のではない。

今年度は、昨年度分子同定した腎尿細管上皮細胞の刷子縁膜に局在するヒト H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE1、MATE2-K) についての十分な cSNP に関する情報がないことから、その頻度や輸送活性に及ぼす影響などを調べた。また、極性細胞におけるカチオン性化合物の上皮輸送モデル細胞として、MATE1 と側底膜型有機カチオントランスポータ (OCT1 あるいは OCT2) との共発現系を作成し、その有用性を評価した。さらに、第2年度までに同定された rSNP の頻度や各トランスポータの基質薬物などから、臨床薬物動態解析の候補薬物として糖尿病治療薬メトホルミンを選択し、メトホルミンの体内動態に及ぼす OCT2、MATE1 並びに MATE2-K の SNP の影響について検討を加えた。

B. 研究方法

1) MATE1 及び MATE2-K の cSNP 解析

腎不全患者 (89 人) 由来のゲノム DNA を精製し、MATE1 並びに MATE2-K の全エクソンを PCR により増幅した。PCR 産物の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 cSNP を導入した変異体を作成し、MATE の典型的基質である [¹⁴C]tetraethylammonium (TEA) を用いた *in vitro* 輸送実験によって、その輸送活性に及ぼす影響について検討した。また、cell surface biotinylation 法によって変異体トランスポータの膜での発現を調べた。併せて、従来から H⁺/有機カチオンアンチポータの輸送活性に重要な役割を果たすことが報告されているヒスチジン残基やシステイン残基の変異体も作成し、必須アミノ酸残基の同定も試みた。

2) hOCT/hMATE1 double transfectants の構築

hOCT1 あるいは hOCT2 cDNA/pcDNA3.1(+) 並びに、hMATE1 cDNA/pcDNA3.1(+)/Hygro をリポフェクション法により、有機カチオン輸送系の発現していない培養腎上皮細胞 MDCK に同時に導入した。G418 及び Hygromycin 両薬物への耐性株をクローン化し、有機カチオントランスポータの典型的基質である TEA の取り込み活性および RT-PCR 法による各トランスポータ mRNA の発現を指標にクローンを選択した。単離した安定発現細胞を多孔性フィルター上

に単層培養し、放射標識した薬物の経細胞輸送量および細胞内蓄積量を液体シンチレーション法で測定した。

3) メトホルミンの臨床薬物動態解析と OCT2、MATE1 並びに MATE2-K のゲノム解析の相関

2005年8月から2007年7月に京都大学医学部附属病院に入院しメトホルミンが処方された患者81名のカルテ調査を行った。また同意の得られたメトホルミン服用患者の16名に対して、服用直前、4時間後、9時間後に採血を行い、HPLC法を用いてメトホルミン血中濃度を測定した。得られた血中濃度をもとに、各患者におけるメトホルミンの消失半減期を算出した。また、各患者の血液よりゲノムを抽出し、OCT2、MATE1、MATE2-Kの遺伝子多型解析を行ない、メトホルミンの半減期との相関を調べた。

(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徹底すること、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。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) MATE1 及び MATE2-K の cSNP 解析

MATEは最近、分子同定されたトランスポータであり、rSNPのみならずアミノ酸変異を伴うcSNPに関する情報は乏しかった。そこで、MATE1並びにMATE2-Kの全エクソンを対象にして、cSNP解析を行なった(N=89)。MATE1ではアミノ酸変異を伴う遺伝子多型が5つ、またMATE2-Kでは2つ認められ、いずれも新規の遺伝子多型であった。Table 1に同定された遺伝子多型の頻度やアミノ酸変異などを示した。アミノ酸の変異を伴う遺伝子多型では、いずれもホモで変異の患者は認められなかった。

そこで、これらのアミノ酸変異が輸送活性にどのような影響を及ぼすかについて検討を加えた。その結果、両トランスポータのいずれのアミノ酸変異でも有意な輸送活性の減少が認められ、特にMATE1 G64DやMATE2-K G211Vでは完全に輸送活性が消失した(Fig. 1)。またcell surface biotinylation法によって膜での発現を調べたところ、wild typeに比べてMATE1 D328A、MATE2-K K64N、MATE2-K G211Vでは有意に膜でのタンパク発現が減少していたが、他の変異体では有意な変動は認められなかった。従って、輸送活性が完全に消失した変異体では、当該のアミノ酸が輸送活性に必須であること、またMATE1 D328、MATE2-K K64、MATE2-K G211は、膜へのソーティングに重要な役割を果たしていることが示唆された。

我々は以前、H⁺/有機カチオンアンチポータの輸送活性が、ヒスチジン修飾剤であるdiethyl pyrocarbonate (DEPC)及びSH基修飾剤のp-chloromercuribenzenesulfonate (PCMBS)の前処理により低下することを報告した。そこで、MATE1の輸送活性に必須なヒスチジン残基及びシステイン残基の同定を試みた。ラットMATE1の保存性システイン残基のうち、第1並びに第3番目の膜貫通領域に存在するシステイン変異体で、輸送活性が顕著に低下した。一方、ヒスチジン残基では、第10番目の膜貫通領域のヒスチジン変異体で輸送活性が低下した。またヒトMATE1やMATE2-Kについても、これらのアミノ酸残基は輸送機能に必須であることが示された。

Transpoter	rSNP	cSNP	Allele	Allele Frequency (%)	Genotype	Number
hMATE1	G-32A promoter		G	98.3	G/G	86
			A	1.7	G/A	3
						A/A
		V10L exon1 cDNA 28	G	97.8	G/G	85
			T	2.2	G/T	4
					T/T	0
		R11R exon1 cDNA 33	C	99.4	C/C	88
			T	0.6	C/T	1
					T/T	0
		A42A exon1 cDNA 126	T	99.4	T/T	88
			C	0.6	T/C	1
					C/C	0
		G64D exon2 cDNA 191	G	99.4	G/G	88
			A	0.6	G/A	1
					A/A	0
		L236L exon8 cDNA 708	C	90.4	C/C	74
			T	9.6	C/T	13
					T/T	2
		A310V exon11 cDNA 929	C	97.8	C/C	85
			T	2.2	C/T	4
				T/T	0	
	D328A exon11 cDNA 983	A	99.4	A/A	88	
		C	0.6	A/C	1	
				C/C	0	
	N474S exon16 cDNA 1421	A	99.4	A/A	88	
		G	0.6	A/G	1	
				G/G	0	
hMATE2-K	C-51T promoter		C	63.5	C/C	36
			T	36.5	C/T	41
					T/T	12
		K64N exon2 cDNA 192	G	99.4	G/G	88
			T	0.6	G/T	1
					T/T	0
		S69S exon2 cDNA 207	G	94.4	G/G	79
			A	5.6	G/A	10
					A/A	0
		G115G exon4 cDNA 345	C	63.5	C/C	37
			A	36.5	C/A	39
					A/A	13
		G211V exon8 cDNA 632_633	GC	98.3	GC/GC	86
	TT		1.7	GC/TT	3	
				TT/TT	0	
	Y295Y exon10 cDNA 885	C	51.1	C/C	25	
		T	48.9	C/T	41	
				T/T	23	

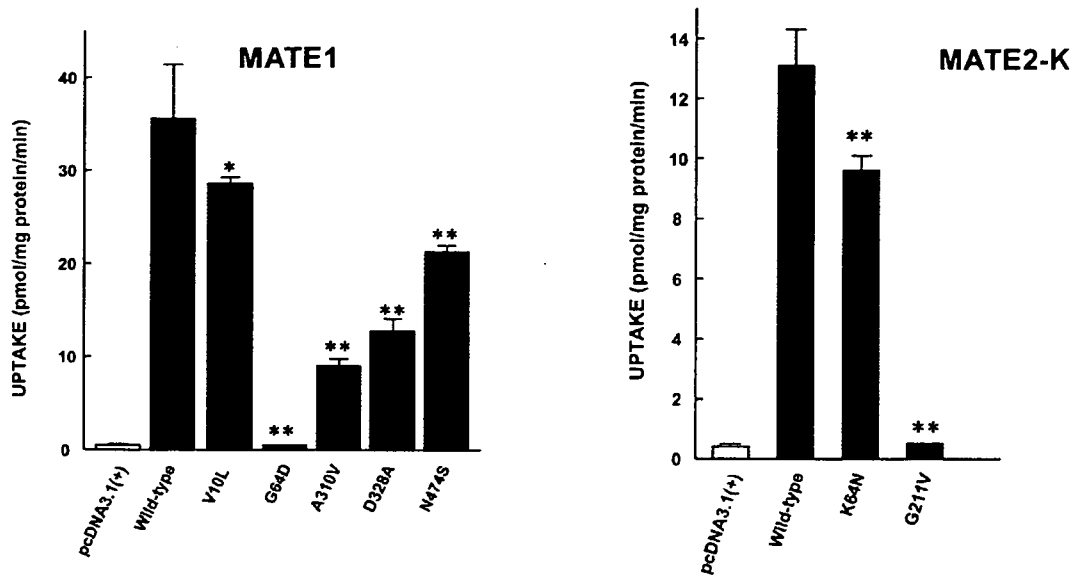


Fig. 1. MATE1 及び MATE2-K 変異体による TEA 輸送

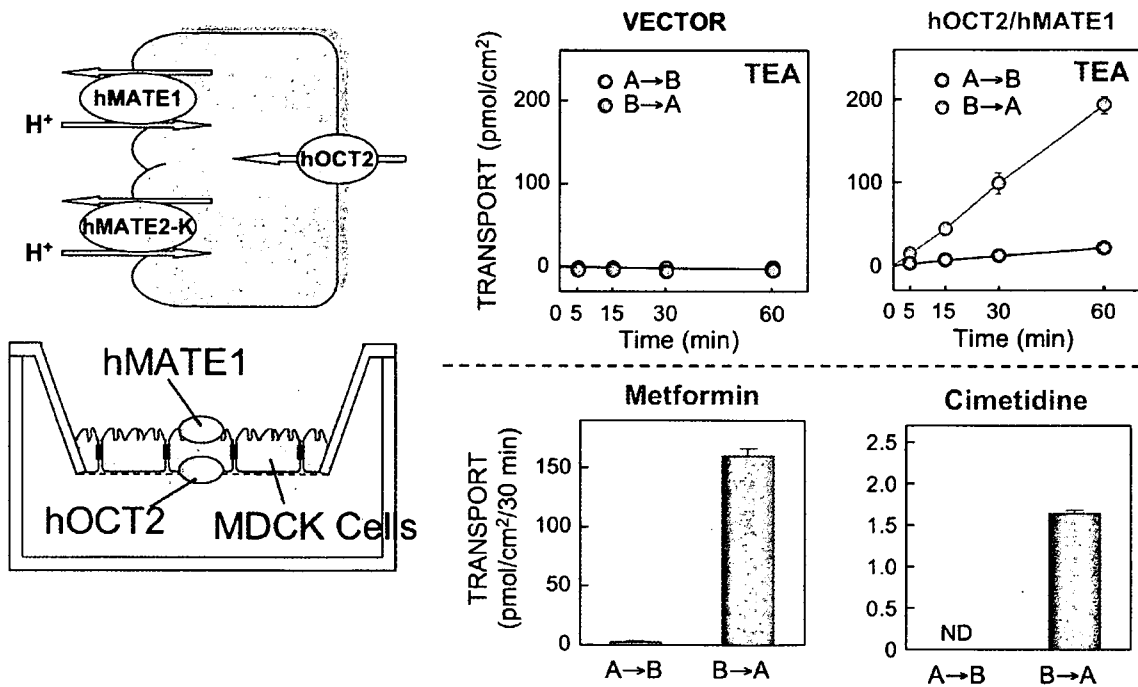


Fig. 2. hOCT2/hMATE1 double transfectant の構築

2) hOCT/hMATE1 double transfectants の構築

これまで培養腎上皮細胞のモデル系としては、ブタ由来の LLC-PK₁ やフクロネズミ由来の OK が繁用されてきたが、ヒト由来の適切な尿細管モデルの極性上皮細胞は存在しなかった。そこでヒトにおけるカチオン性薬物の経細胞輸送を適切に評価するために、hOCT1/hMATE1 (肝臓) 並びに hOCT2/hMATE1

(腎臓) の double transfectants を作製した (Fig. 2)。

両安定発現細胞において、側底膜側もしくは頂側膜側に [¹⁴C]TEA を添加し、経時的に経細胞輸送量を評価したところ、側底膜側から頂側膜側への方向選択的な輸送と側底膜側からの細胞内蓄積量の増大が観察された (Fig. 2)。これらの結果から、側底膜側に hOCT1 または hOCT2、頂側膜側に hMATE1 を

同時発現させることによる方向選択的な TEA 輸送を再現することができた。これまで hMATE1 の輸送特性は主に、取り込み方向によって評価されており、排出方向での輸送特性に関しては情報が乏しい。そこで構築した安定発現細胞を用いて、尿細管分泌を受ける種々カチオン性薬物（糖尿病治療薬：メトホルミン、H₂ブロッカー：シメチジンなど）の経細胞輸送解析を行った結果、いずれも尿細管分泌に対応した側底膜側から頂側膜側への方向選択的な輸送が認められた (Fig. 2)。さらに、*in vivo* において尿細管分泌を受けることが報告されているものの、個々のトランスポータ発現系では明確な有機カチオントランスポータの関与が示唆されなかったキニジンについても同様の検討を加えた。その結果、分泌方向に相当する輸送が観察され、キニジンの尿細管分泌には有機カチオン輸送系が関与することが示唆された。これらの結果より、構築した double transfectants はヒトにおけるカチオン性薬物の尿細管分泌機構を評価する上で有用なモデルとなりうることが判明した。

3) ヒトにおけるメトホルミンの体内動態と遺伝子多型の関連性

メトホルミンの効果・副作用発現に関して 81 名のカルテ情報を調査した。メトホルミン服用開始 1 ヶ月後より HbA1c の有意な低下が認められた。副作用の発現頻度は 25% で、全て消化器症状を呈するものであった。重篤な副作用である乳酸アシドーシスの発現は認められなかった。さらに、副作用発現に関連する因子を探索したところ、糖尿病性腎症の病期が抽出された。

次に、16 名のメトホルミン服用患者において投与

4 時間後および 9 時間後の血中濃度を測定し、消失半減期を算出した。平均値は 6.4 時間であったが、各人の値は 2.5-11.9 時間と大きなばらつきを示した。メトホルミンの消失半減期に及ぼす性別、併用薬、クレアチニンクリアランス（ほぼ全ての患者で正常値）など臨床データとの関連について統計学的な解析を行なったが、有意な相関は認められなかった。

最後にメトホルミンの消失半減期に及ぼす有機カチオントランスポータ (OCT2、MATE1、MATE2-K) の遺伝子多型の影響を調べた。OCT2 はエクソン 1 からエクソン 11 までのイントロン領域を含む全ての遺伝子配列と、プロモーター領域の 3 塩基欠損 (-578_-576delAAG) を調べた (Table 2)。MATE1 は、rSNP (-32G>A) と 1) の cSNP 解析で見出された多型を調べた。また MATE2-K でもアミノ酸変異を伴う cSNP と rSNP (-51C>T) を調べた。

3-1) OCT2

A270S とアミノ酸変異を引き起こす cSNP を有する患者が 2 名同定された (いずれもヘテロ)。しかし、メトホルミン消失半減期との関連は認められなかった (Fig. 3)。また、プロモーター領域の 3 塩基欠損 (-578_-576delAAG) の患者が 3 名同定された (いずれもヘテロ)。他方、メトホルミンの消失半減期の短い患者において、イントロン 1-3 に SNPs が高頻度に認められた (Table 2)。

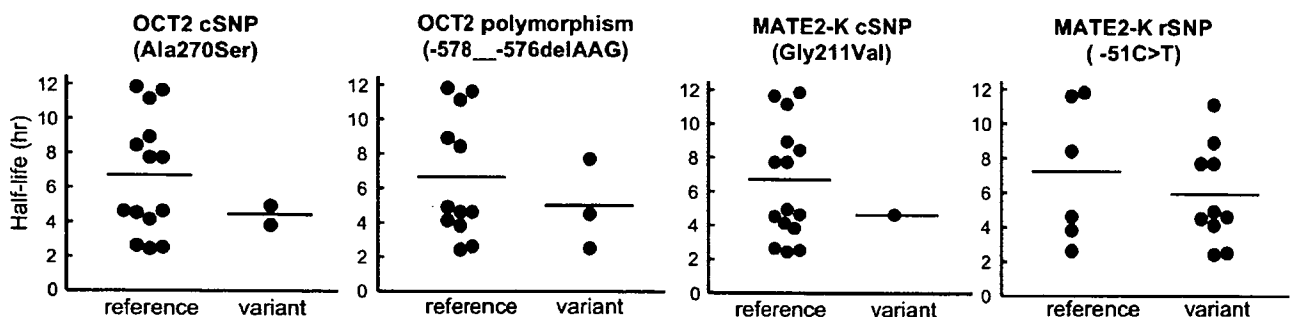


Fig. 3. OCT2 及び MATE2-K の SNP のメトホルミン消失半減期に及ぼす影響

Table 2. メトホルミンの消失半減期と OCT2 遺伝子多型との相関

SNP position	Location	AA Change	db SNP cluster ID	Allele	Half-life (hr)															
					11.9	11.7	11.2	9	8.5	7.8	7.8	5	4.7	4.7	4.6	4.2	3.9	2.7	2.6	1.5
2966004	promoter			AAG deletion	AAG/AAG	AAG/AAG	AAG/AAG	AAG/AAG	AAG/AAG	AAG/AAG	AAG/AAG	AAG/AAG	AAG/AAG	AAG/AAG	AAG/AAG	AAG/AAG	AAG/AAG	AAG/AAG	AAG/AAG	
2966741	Exon 1	T to T	rs2424249	G/T	G/G	G/G	G/G	G/T	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
2966331	Exon 1	-	-	C/G	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	
2966917			rs3912162	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	
2968004			rs638360	C/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	
2964955	Exon 2		rs2774230	C/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
2963658			rs3842083	G deletion	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	
2963557			rs3798156	C/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
2963185			rs316009	A/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
2968041	Exon 3		rs316016	A/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
2967874			rs316017	G/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	
2957035			rs316018	T/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	
2957633	Exon 4	A to T	rs316019	T/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
2955720	Exon 4		rs2279463	T/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	
2955382	Exon 5		rs316021	G/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	
2954941			rs316022	G/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	
2953697	Exon 6		rs617217	G/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	
2953002			rs315995	C/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	
2952704			rs315994	T/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	
2952605				C/T	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	
2951524	Exon 7		rs315993	C/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	
2949444	Exon 9		rs315990	G/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	
2949431-2			rs11397542	A insertion	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	
2933706			rs316006	A/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	
2933621			rs316005	A/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
2933583			rs3798158	A/C	C/C	C/C	C/C	C/A	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	
2933514			rs316004	A/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	
2933383-3			rs3219197	A insertion	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	A+	
2933173	Exon 10	Val 502 Val	rs316003	G/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	
2931833	Exon 10		rs3127575	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
2927315			rs2932082	C/T	C/T															
2927162			rs3798159	A/C	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	
2926033			rs3798160	G/C	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
2926135-6				A deletion	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	
2926096			rs2450973	A/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	
2926086			rs2450974	C/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	
2925445	Exon 11	non-ORF	rs3127594	A/T	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	
2925417			rs3103353	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	
2925344			rs3127593	T/A	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	
2925316			rs2450975	C/A	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	

3-2) MATE1

MATE1では、アミノ酸変異を伴う cSNP や-32G>A の rSNP を有する患者は認められなかった。

3-3) MATE2-K

MATE2-K においてアミノ酸変異を引き起こす cSNP (G211V) を有する患者が一人存在し、メトホルミン消失半減期は 4.7 時間と比較的短かった (Fig. 3)。in vitro ではこの変異によって輸送活性が減少することから、in vivo と in vitro の結果は対応しないことが推察された。また rSNP (-51C>T) をヘテロで有する患者が 9 名、ホモで有する患者が 1 名見出されたが、各群間で消失半減期の有意な差は認められなかった (Fig. 3)。

D. 考察

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 (OCT) と、刷子縁膜に局在する H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE) 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。一方、MATE の分子実体は 2005 年に同定されたばかりで、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。昨年度我々は、2 種類のヒトアイソフォーム MATE1、MATE2-K と 1 種類のラットアイソフォーム MATE1 cDNA を同定し、臓器分布、局在、機能特性、転写制御機構などの特性を明らかにした。例えば、MATE1 の基礎転写には Sp1 が関与すること、また Sp1 結合部位の GC Box に-32G>A となる rSNP を同定し、Sp1 の結合やプロモーター活性を約 50% 低下させることを明らかにした。しかし、rSNP 以外のゲノム情報、特にアミノ酸変異を伴う cSNP に関する情報は不足しており、カチオン性薬物の腎動態に影響を及ぼすか否か、早急に解決する必要があった。

MATE1 並びに MATE2-K の cSNP 解析を行なった結果、輸送活性に影響を及ぼす数種類の cSNP を初めて同定した。しかしいずれの SNP も頻度は低く、これらの遺伝子多型によってカチオン性薬物の体内動態の個体差を説明することは困難であることが推察された。実際、メトホルミン服用患者において MATE1 の SNPs は確認されなかった。MATE2-K において機能欠損する cSNP (G211V) を持つ患者が 1 名見つかったが、この患者のメトホルミンの消失半減期は比較的短く、in vitro との結果と対応していな

かった。従って、MATE2-K のヘテロの機能欠損ではカチオン性薬物の消失には影響しないことが示唆された。これまでに、ヒト腎臓の刷子縁膜には MATE1 および MATE2-K が共に発現すること、さらにこれらの基質認識特性が比較的近いことを示しており、MATE1 と MATE2-K は協調的、代償的に働く可能性が推察される。しかし、オキサリプラチンなど一部 MATE2-K 特異的な基質があり、また細胞毒性を有することから、MATEs cSNP による薬物体内動態・副作用発現への影響を含め更なる検討が必要である。

生理的には MATE は腎刷子縁膜における基質の排出を媒介しているが、これまでのトランスポータ発現系による取り込み実験では、in vivo における経細胞輸送を反映することは困難であった。本研究において、MDCK 細胞を宿主とし側底膜側にヒトの OCT、頂側膜側にヒトの MATE1 を発現させた double transfectant の構築を試み、カチオン性薬物の経細胞輸送を評価する上で有用なモデル系であることを初めて実証した。特に、脂溶性の高いカチオン性薬物の評価においては大変有用であると考えられる。例えば、キニジンは生理的条件下においてカチオンとして存在し、ヒトにおける非結合型の腎クリアランスがクレアチニンクリアランスに比して 5 倍高値であることから、尿細管分泌を受けることが報告されている。一方、キニジンは脂溶性が高く、HEK293 細胞を宿主とした発現系における取り込み実験では、OCT および MATE1 を介したトランスポータ特異的な取り込み量の増大は観察されない。しかしながら、今回構築した double transfectant を用いて経細胞輸送解析を行った結果、側底膜側から頂側膜側への方向選択的な輸送が観察され、キニジンの尿細管分泌には有機カチオン輸送系が関与することが示された。さらにキニジン同様、プロカインアミドは、シメチジン併用により腎クリアランスの低下することが報告されているものの、取り込み実験では OCT および MATE1 を介した取り込み量の増大を明確に観察することは困難であった。しかし、double transfectant を用いることによって、プロカインアミドの尿細管分泌にも有機カチオン輸送系が関与していることが示された。従って、本 double transfectant は、ヒトにおけるカチオン性薬物の排泄メカニズムや細胞毒性を評価または予測する上で有用な in vitro 評価系であると考えられる。

糖尿病治療薬メトホルミンは側底膜側の OCT2 および刷子縁膜側の MATE1 及び MATE2-K の良好な

基質であり、タンパク結合は低く、殆どが速やかに腎臓から排泄されることから、有機カチオン輸送系の機能評価を行う最も優れたプローブドラッグであることが我々を含め幾つかのグループによって示されてきた。日本人では OCT2 のアミノ酸変異を伴う cSNP として唯一 A270S が確認されており、*in vitro* の検討において 50% の機能低下が報告されている。本検討において、A270S の cSNP をヘテロに持つ患者が 16 名中 2 名見つかった。また OCT2 のプロモーター領域の 3 塩基欠損の遺伝子多型や、MATE2-K の cSNP や rSNP を有する患者も見受けられた。全患者におけるメトホルミンの消失半減期は 2.5-11.9 時間と大きな個体差が認められたが、有機カチオントランスポータ群の遺伝子多型との有意な関連性は現在のところ認められていない。遺伝子多型の影響を統計的に評価するためには、N=34 が必要と算出されており、現在も臨床研究を継続中である。一方、連鎖のあるイントロン 1-3 部位の SNPs は、メトホルミンの消失半減期の短い人で高頻度に認められた。その分子機構は未解明であるが、OCT2 発現・機能変化によるクリアランスの増大が起こっている可能性が示唆され、その生物学的意義を明らかにすることも今後の課題であろう。

E. 結論

MATE1 並びに MATE2-K の cSNP 解析の結果、輸送活性が有意に低下する cSNP が MATE1 遺伝子で 5 種類、MATE2-K 遺伝子で 2 種類同定された。特に、MATE1 G64D と MATE2-K G211V のアミノ酸変異体は、完全に輸送活性が消失した。ヒトにおけるカチオン性薬物の経細胞輸送を評価するために、ヒトの OCT/MATE1 の double transfectants を作製し、その有用性を示すことができた。糖尿病治療薬メトホルミンの消失半減期に及ぼす有機カチオントランスポータ (OCT2, MATE1, MATE2-K) の影響を調べたところ、これらトランスポータの cSNP や rSNP との有意な関連は現在のところ認められていないが、消失半減期の短い患者において、OCT2 遺伝子のイントロン 1-3 に SNPs が高頻度に認められた。

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. 米澤 淳, 乾 賢一: H⁺/organic cation antiporter (MATE/SLC47A). 腎と透析, 63(4), 466-469, 2007
2. 寺田智祐, 乾 賢一: H⁺/有機カチオンアンチポータ(MATE/SLC47A). Annual Review 腎臓 2008, 御手洗哲也, 東原英二, 秋澤忠男, 五十嵐隆, 金井好克編, 36-42, 中外医学社 (2008)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. Matsuzaki, T., Watanabe, H., Yoshitome, K., Morisaki, T., Hamada, A., Nonoguchi, H., Kohda, Y., Tomita, K., Inui, K. and Saito H.: Downregulation of organic anion transporters in rat kidney under ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. *Kidney Int.*, **71**(6), 539-547 (2007)
7. 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.*, **321**(2), 684-689 (2007)
8. 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.*, **71**(6), 1487-1493 (2007)
9. 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.*, **292**(6), F1819-F1826 (2007)
10. 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.*, **74**(1), 161-168 (2007)
11. Tanihara, Y., Masuda, S., Sato, T., Katsura, T., Ogawa, O. and Inui, K.: Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H⁺-organic cation antiporters. *Biochem. Pharmacol.*, **74**(2), 359-371 (2007)
 12. 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.*, **74**(3), 477-487 (2007)
 13. Ueo, H., Motohashi, H., Katsura, T. and Inui, K.: Cl⁻-Dependent up-regulation of human organic anion transporters: Different effects on transport kinetics between hOAT1 and hOAT3. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **293**(1), F391-F397 (2007)
 14. Jiko, M., Yano, I., Sato, E., Takahashi, K., Motohashi, H., Masuda, S., Okuda, M., Ito, N., Nakamura, E., Segawa, T., Kamoto, T., Ogawa, O. and Inui, K.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of paclitaxel with carboplatin or gemcitabine and effects of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms in patients with urogenital cancers. *Int. J. Clin. Oncol.*, **12**(4), 284-290 (2007)
 15. Kajiwara, M., Terada, T., Asaka, J., Ogasawara, K., Katsura, T., Ogawa, O., Fukatsu, A., Doi, T. and Inui, K.: Critical roles of Sp1 in gene expression of human and rat H⁺/organic cation antiporters (MATE1). *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **293**(5), F1564-F1570 (2007)
 16. Hodoshima, M., Masuda, S. and Inui, K.: Decreased renal accumulation and toxicity of a new VCM formulation in rats with chronic renal failure. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **22**(6), 419-427 (2007)
 17. Takahashi, K., Yano, I., Katsura, T., Takahashi, T., Ito, N., Yamamoto, S., Ogawa, O. and Inui, K.: Distinct effects of omeprazole and rabeprazole on the tacrolimus blood concentration in a kidney transplant recipient. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **22**(6), 441-444 (2007)
 18. Terada, T. and Inui, K.: Impact of drug transport proteins. In *Drug Absorption Studies - In Situ, In Vitro and In Silico Models*, ed. by Ehrhardt, C. and Kim, K., pp 559-576, Springer, New York (2008)
 19. Matsuzaki, T., Morisaki, T., Sugimoto, W., Yokoo, K., Sato, D., Nonoguchi, H., Tomita, K., Terada, T., Inui, K., Hamada, A. and Saito, H.: Altered pharmacokinetics of cationic drugs caused by down-regulation of renal rOCT2 (Slc22a2) and rMATE1 (Slc47a1) in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Drug Metab. Dispos.*, **36**(4), 649-654 (2008)
 20. Hosohata, K., Masuda, S., Ogura, Y., Oike, F., Takada, Y., Katsura, T., Uemoto, S. and Inui, K.: Interaction between tacrolimus and lansoprazole, but not rabeprazole in living-donor liver transplant patients with defects of CYP2C19 and CYP3A5. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, in press.
 21. Nakagawa, H., Hirata, T., Terada, T., Jutabha, P., Miura, D., Harada, K., Inoue, K., Anzai, N., Endou, H., Inui, K., Kanai, Y. and Koizumi, A.: Roles of organic anion transporters in the renal excretion of perfluorooctanoic acid. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, in press.
 22. Nishio, N., Katsura, T. and Inui, K.: Thyroid hormone regulates the expression and function of P-glycoprotein in Caco-2 cells. *Pharm. Res.*, in press.
 23. Terada, T. and Inui, K.: Physiological and pharmacokinetic roles of H⁺/organic cation antiporters (MATE/SLC47A). *Biochem. Pharmacol.*, in press.
 24. Ogasawara, K., Terada, T., Motohashi, H., Asaka, J., Aoki, M., Katsura, T., Kamba, T., Ogawa, O. and Inui, K.: Analyses of regulatory polymorphisms in organic ion transporter genes (SLC22A) in the kidney. *J. Hum. Genet.*, in press.
2. 学会発表
 1. Inui, K.: Pharmacogenomics of MDR1/ABCB1 and CYP3As in tacrolimus therapy after organ transplantation. PSWC2007 (April 2007, Amsterdam, The Netherlands)
 2. Katsura, T., Nishio, N. and Inui, K.:

- Transcriptional activation of MDR1 gene by thyroid hormone receptor. PSWC2007 (April 2007, Amsterdam, The Netherlands)
3. Terada, T., Asaka, J., Tsuda, M., Katsura, T. and Inui, K.: Functional roles of cysteine and histidine residues in rat H⁺/organic cation antiporter MATE1. PSWC2007 (April 2007, Amsterdam, The Netherlands)
 4. Tsuda, M., Terada, T., Asaka, J., Ueba, M., Katsura, T. and Inui, K.: Identification of a driving force of H⁺/organic cation antiporter rat and human MATE1 using plasma membrane vesicles. PSWC2007 (April 2007, Amsterdam, The Netherlands)
 5. Ogasawara, K., Terada, T., Asaka, J., Katsura, T. and Inui, K.: Regulatory mechanisms for gene expression of human organic anion transporters. PSWC2007 (April 2007, Amsterdam, The Netherlands)
 6. 津田真弘、上羽美貴、寺田智祐、桂 敏也、乾 賢一：H⁺/有機カチオンアンチポータ MATE1 の輸送機能解析と駆動力の同定. 日本膜学会第 28 年会 (2007 年 5 月、東京都)
 7. 下村昌寛、増田智先、桂 敏也、乾 賢一：抗不整脈薬プロカインアミドの臓器指向性規定因子としての OCT の関与. 日本薬剤学会第 22 年会 (2007 年 5 月、大宮)
 8. 佐藤朋子、米澤 淳、谷原悠子、増田智先、桂 敏也、乾 賢一：hOCT/hMATE1 ダブルトランスフェクタントの構築と経細胞輸送解析. 日本薬剤学会第 22 年会 (2007 年 5 月、大宮)
 9. 寺田智祐、朝賀純一、津田真弘、桂 敏也、乾 賢一：H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE) の輸送活性を規定するアミノ酸残基の同定. 第 50 回日本腎臓学会学術総会 (2007 年 5 月、浜松)
 10. 谷原悠子、増田智先、佐藤朋子、米澤 淳、桂 敏也、乾 賢一：ヒト腎尿細管の有機カチオン輸送系における薬物輸送機構の解明. 第 50 回日本腎臓学会学術総会 (2007 年 5 月、浜松)
 11. Katsura, T.: Drug-drug interaction and its importance for the safe and effective pharmacotherapy. 4th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery (June 2007, Kanazawa)
 12. Yokoo, S., Yonezawa, A., Masuda, S., Katsura, T. and Inui, K.: OCT and MATE families are key transporters in platinum agents-induced nephrotoxicity. 4th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery (June 2007, Kanazawa)
 13. 乾 賢一：免疫抑制剤の臨床と代謝物を考慮した TDM. 第 24 回日本 TDM 学会・学術大会 (2007 年 7 月、金沢)
 14. Inui, K.: Molecular characterization of H⁺/organic cation antiporters (MATEs). BioMedical Transporters 2007 (July 2007, Bern, Switzerland)
 15. Tanihara, Y., Masuda, S., Yonezawa, A., Katsura, T. and Inui, K.: Structural characteristics and substrate specificity of hMATE2-K. BioMedical Transporters 2007 (July 2007, Bern, Switzerland)
 16. Nishihara, K., Masuda, S., Katsura, T. and Inui, K.: Expressional and functional changes in rat H⁺/organic cation antiporter MATE1 in chronic renal failure. BioMedical Transporters 2007 (July 2007, Bern, Switzerland)
 17. 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 OAT1 及び OAT3 の転写制御機構. 第 13 回分子腎臓研究会 (2007 年 9 月、東京都)
 18. 乾 賢一：薬物動態制御因子の薬理ゲノミクスと個別化薬物療法. Symposium on Bioinformatics and Chemical Genomics (2007 年 9 月、京都)
 19. Inui, K.: Personalized tacrolimus therapy in patients after liver transplantation. 8th International ISSX Meeting (October 2007, Sendai)
 20. Hosohata, K., Masuda, S., Katsura, K., Ogura, Y., Oike, F., Takada, Y., Uemoto, S. and Inui, K.: Role of intestinal CYP2C19 in drug interaction between tacrolimus and proton pump inhibitors in living-donor liver transplant patients. 8th International ISSX Meeting (October 2007, Sendai)
 21. Kajiwara, M., Terada, T., Asaka, J., Ogasawara, K., Katsura, T. and Inui, K.: Promoter analyses of human and rat H⁺/organic cation antiporter (MATE1). 8th International ISSX Meeting (October 2007, Sendai)

- | | |
|---|--|
| <p>22. Inui, K.: Pharmacogenomic on tacrolimus therapy in liver transplant patients. Joint Cold Spring Harbor Laboratory/Wellcome Trust Conference (October 2007, Hinxton, UK)</p> <p>23. Shimomura, M., Masuda, S., Terada, T., Yonezawa, A., Tanihara, Y., Katsura, T. and Inui, K.: Procainamide and N-acetylprocainamide are superior substrates for hepatic organic cation transporter OCT1 rather than renal OCT2. 2007 AAPS Annual Meeting and Exposition (November 2007, San Diego, USA)</p> <p>24. Terada, T., Tsuda, M., Irie, M., Matsuoka, S., Katsura, T. and Inui, K.: Effect of substrate charges on H⁺-coupled peptide transport by PEPT1/SLC15A1. 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4回国際シンポジウム (2007年11月、京都)</p> <p>25. Inui, K.: Role of OCTs and MATEs in the renal secretion of drugs. The Impact of Pharmacokinetics in Modern Drug Development-10 Years Later (November 2007, San Francisco, USA)</p> <p>26. 米澤 淳、横尾幸子、増田智先、桂 敏也、乾 賢一：有機カチオントランスポータ hOCT2、hMATE1、hMATE2-K を規定因子とする白金系抗がん剤の腎挙動と毒性。第29回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2007年11月、仙台市)</p> <p>27. 寺田智祐、乾 賢一：小腸及び腎薬物トランスポータの基礎と臨床。第一回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2007年12月、東京都)</p> <p>28. Inui, K.: Pharmacogenomics of immunosuppressants. PGRN-RIKEN-JSSX Joint Workshop on Pharmacogenomics in Drug Development (February 2008, Tokyo)</p> <p>29. 陳嘉蓉、寺田智祐、小笠原健、桂 敏也、乾 賢一：EHBR における腎有機アニオントランスポータ OAT の発現変動及び輸送解析。日本薬学会第128年会 (2008年3月、横浜市)</p> <p>30. Inui, K.: Pharmacogenomics of SLC22A/OCT, OAT and SLC47A/MATE drug transporters. 2008 International Conference on Pharmacogenomics (April 2008, Busan, Republic of Korea)</p> | <p>H. 知的財産権の出願・登録状況</p> <p>1. 特許取得
特になし</p> <p>2. 実用新案登録
特になし</p> <p>3. その他
特になし</p> |
|---|--|

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
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の H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE1) が発現している。昨年度までは、肝臓のサンプルは N=30 と少数であったが、今年度は解析数を N=109 まで増加させ以下の項目について検討を加えた。1) 種々薬物トランスポータの発現量定量、2) rSNP 解析、3) 発現量と rSNP や臨床検査値との相関解析。発現量解析の結果、SLC トランスポータでは、OATP2B1 > OCT1 > OAT2 > OATP1B1 > OATP1B3 > 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。rSNP 解析の結果、mRNA 発現量に影響を及ぼす OATP2B1 の遺伝子多型を同定した。またこれまで発現量に影響を及ぼすことが報告されていた MRP2 -24C>T の rSNP は、MRP2 mRNA 発現量に有意な影響を及ぼさなかった。18 種類の薬物トランスポータについて、肝炎ウイルス感染及び肝硬変が薬物トランスポータの発現量に及ぼす影響を調べたところ、ウイルス非感染かつ非肝硬変群に比べて、ウイルス感染かつ肝硬変群において OCT1 等の 6 種類の薬物トランスポータの発現量が有意に低下し、MRP4 などの 3 種類の薬物トランスポータの発現量が有意に上昇した。これらの成果は、肝薬物トランスポータの発現量に影響を与える因子を初めて抽出したものであり、今後の肝指向性薬物の投与設計において有用な臨床情報を提供するものと考えられる。

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、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。昨年度までに、これら薬物トランスポータ群 (22 種類) の発現量解析を N=30 で行なってきたが、本年度は患者数を N=109 まで増加させ、かつ発現量の多かった 18 種類の薬物トランスポータに焦点を当てて発現プロファイルを作成した。また SLC トランスポータのうち、発現量の多かった

OCT1/SLC22A1、OAT2/SLC22A7、OATP1B1/SLCO1B1、OATP1B3/SLCO1B3、OATP2B1/SLCO2B1 並びに MATE1/SLC47A1 について、プロモーター部位上流約 1 kb について regulatory SNP (rSNP) 解析を行なった。さらに、ABC トランスポーターでは、MRP2/ABCC2 の近位プロモーター領域に存在する -24C>T の rSNP が、MRP2 mRNA 発現量やプロモーター活性に影響を及ぼすことが報告されていることから (Pharmacogenomics J., 7, 56-65, 2007)、本 SNP と MRP2 mRNA 発現量との関係についても調べた。また、肝薬物トランスポーターの発現量に影響を及ぼす rSNP 以外の因子として、肝炎ウイルスの感染の有無、肝硬変の影響などについても検討を加えた。

B. 研究方法

1) 肝薬物トランスポーターの発現量解析

肝摘出術を施行された肝がん患者の非腫瘍部から、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ー発現量を定量した (N=109)。測定した薬物トランスポーターは SLC トランスポーター (10 種類) 並びに ABC トランスポーター (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ーの 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、OATP1B3、OATP2B1、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。また発現量に影響を及ぼすことが報告されている MRP2 の -24C>T の rSNP についても、同様に解析を加えた。また rSNP が多数検出された OATP1B1 並びに OATP2B1 については、ハプロタイプ解析を行った。

3) 薬物トランスポーターの発現量に及ぼす因子の探索

1) で測定した薬物トランスポーターの発現量に及ぼす rSNP、肝炎ウイルス感染、肝硬変の影響について検討を加えた。また、術前の肝機能検査として行なわれている indocyanine green (ICG) 消失率と、ICG の輸送に関与すると考えられるトランスポーターの発現量の関連についても調べた。

(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徹底すること、5) 研究成果の発表に際しては個人が特定できない方法のみ行うこと、6) 実施対象者の個人識別情報は連結可

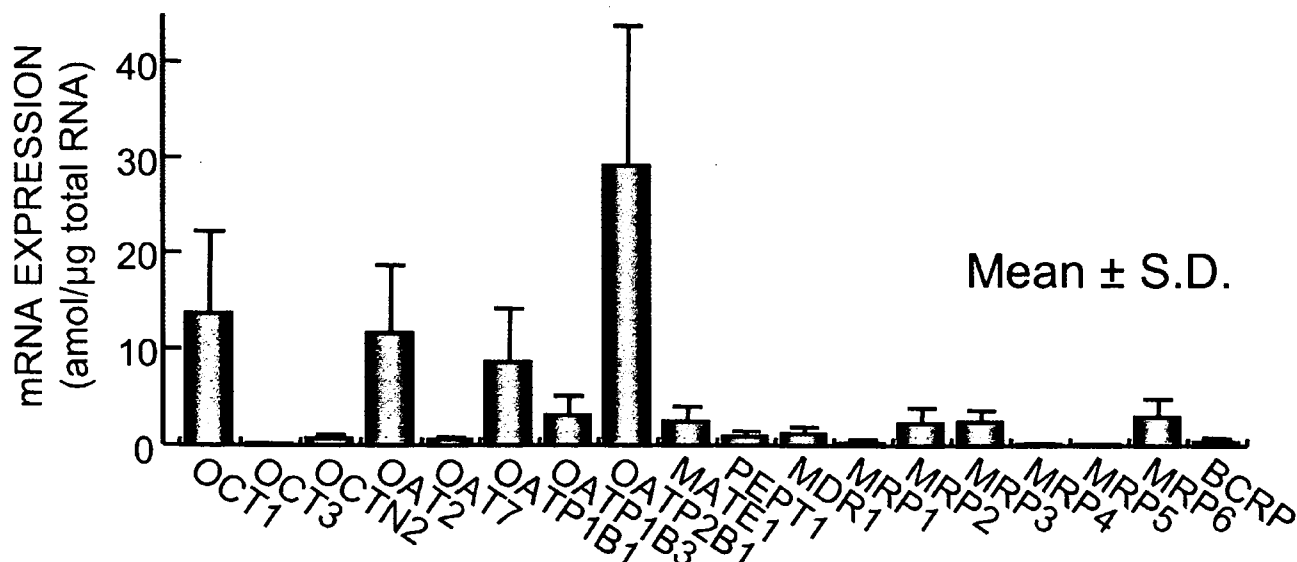


Fig. 1. 肝薬物トランスポーター mRNA の発現プロファイル

Table 1. 肝薬物トランスポータの
rSNP 解析

(*:dbSNP において未報告の rSNP)

Transporter	Position	dbSNP ID	Allele	Allele Frequency (%)	Genotype	Number	
OCT1	*-1083	-	A	99.5	A/A	108	
			G	0.5	A/G	1	
OATP1B1	*-867	-	T	99.5	T/T	108	
			C	0.5	T/C	1	
	-814	rs4149015	G	88.5	G/G	85	
			A	11.5	G/A	23	
					A/A	1	
	*-616	-	G	95.0	G/G	98	
			A	5.0	G/A	11	
	-317	rs11835045	T	95.0	T/T	98	
			C	5.0	T/C	11	
					C/C	0	
	*-92	-	T	99.1	T/T	107	
			C	0.9	T/C	2	
OATP1B3	-503	rs1515766	T	99.1	T/T	107	
			C	0.9	T/C	2	
					C/C	0	
OATP2B1	*-916	-	A	99.5	A/A	108	
			G	0.5	A/G	1	
	-835	rs2851067	G	23.4	G/G	12	
			T	76.6	G/T	27	
					T/T	70	
	-747	rs4100076	A	68.3	A/A	51	
			C	31.7	A/C	47	
	-730	rs2851068	T	23.4	T/T	10	
			C	76.6	T/C	31	
	-618	rs12361540	G	73.4	G/G	61	
			A	26.6	G/A	38	
					A/A	10	
	-282	rs2712807	A	54.1	A/A	34	
			G	45.9	A/G	50	
	*-89	-	G	99.5	G/G	25	
			A	0.5	G/A	1	
	MATE1	*-65	-	C	99.5	A/A	0
				A	0.5	C/C	108
					C/A	1	
*-32	-	G	99.5	A/A	0		
		A	0.5	G/G	108		
MRP2	-24	rs717620	C	79.4	G/A	1	
			T	20.6	A/A	0	
					C/C	69	
					C/T	35	
					T/T	5	

Table 2. OATP2B1 のハプロタイプ
解析

Haplotype No.	-916	-835	-747	-730	-618	-282	-89	Frequency (%)	Diplotype	Frequency (%)
1	A	T	A	C	G	G	G	39.9	1,1	20.2
2	A	T	C	C	A	A	G	18.9	1,2	18.3
3	A	G	A	T	G	A	G	17.4	1,3	6.4
4	A	T	C	C	G	A	G	5.7	1,4	7.3
5	A	T	C	C	A	G	G	3.4	2,2	3.7
6	A	T	A	C	G	A	G	2.9	2,3	10.1
7	A	T	A	T	G	G	G	1.5	3,3	6.4
8	A	G	C	C	G	A	G	1.5		

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

109名の肝臓がん患者から得られた非腫瘍部の肝RNAを用いて、前年度の解析で発現量が多かった、18種類の主要な薬物トランスポータの発現量を定量した。109名のうち、GAPDHの値が極端に低かった4名の患者を除き発現プロファイルを作成した(Fig.1)。SLCトランスポータファミリーでは、OATP2B1、OCT1、OAT2、OATP1B1が高発現しており、OATP1B3や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。

2) 肝薬物トランスポータのrSNP解析

肝臓において発現が多かったOCT1、OAT2、OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、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)。また発現量に影響を及ぼすことが報告されているMRP2の-24C>TのrSNPについても、同様に解析を加えた。

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0.5%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、5つの変異が見つかった。それらは、-867T>C(アレル頻度0.5%)、-814G>A(アレル頻度11.5%)、-616G>A(アレル頻度5%)、-317T>C(アレル頻度5%)、-92T>C(アレル頻度0.9%)であり、このうち-867位、-616位および-92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、-616G>Aと-317T>Cはハプロタイプを形成し、-616位および-317位がともに変異型アレルのハプロタイプ頻度は4.1%であった。このハプロタイプの有無によるOATP1B1 mRNA発現量の差は認められなかった。従って、-616位および-317位の変異は発現量には影響を及ぼさないことが示唆された。

2-4) OATP1B3

OATP1B3では、-503T>Cの変異が見つかり、アレル頻度は0.9%であった。

2-5) OATP2B1

OATP2B1では、7つの変異が見つかった。それらは、-916A>G(アレル頻度0.5%)、-835G>T(アレル頻度77%)、-747A>C(アレル頻度32%)、-730T>C(アレル頻度77%)、-618G>A(アレル頻度27%)、-282A>G(アレル頻度46%)、-89G>A(アレル頻度0.5%)であり、このうち-916位および-89位の変異は今までに報告されていない変異であった。-747位の変異をヘテロあるいはホモでもつ患者では、変異をもたない患者に比べてOATP2B1 mRNA発現量がやや上昇する傾向があった。一方、-835位あるいは-730位の変異をヘテロあるいはホモでもつ患者では、変異をもたない患者に比べてOATP2B1 mRNA発現量がやや低い傾向があった。さらに、-282位の変異をヘテロまたはホモでもつ患者では、変異をもたない患者に比べてOATP2B1 mRNA発現量が有意に低下していた(Fig. 2)。ハプロタイプ解析の結果、-835位、-730位および-282位に変異型アレルを有するハプロタイプが最も高い頻度(39.9%)で観察された(Table 2)。このハプロタイプをヘテロあるいはホモでもつ患者では、このハプロタイプをもたない患者に比べてOATP2B1 mRNA発現量が低下する傾向が認められた(Fig. 2)。その他のハプロタイプのmRNA発現量への影響は認められなかった。

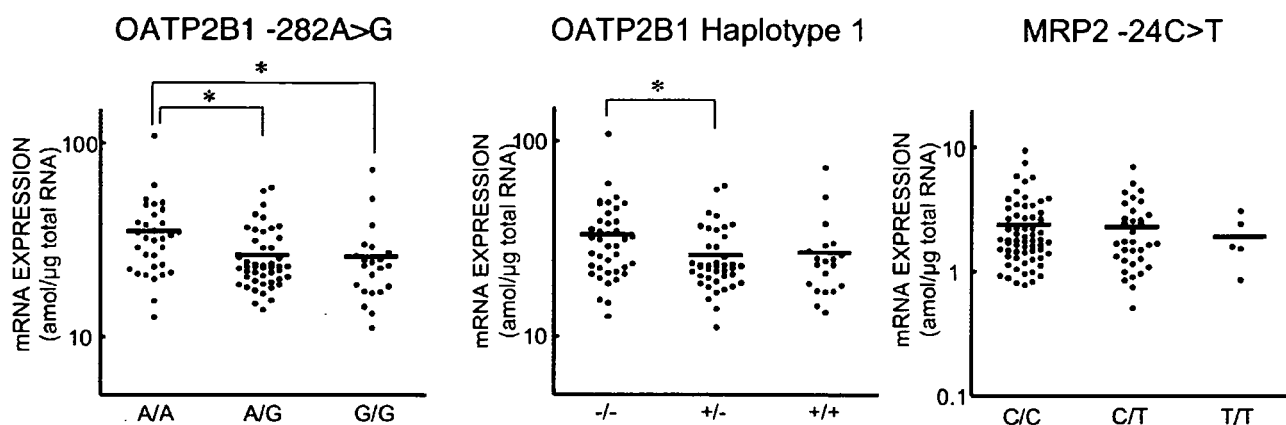


Fig. 2. rSNP 及びハプロタイプの mRNA 発現量に及ぼす影響 (*: $p < 0.05$)

2-6) MATE1

MATE1 では、2つの変異が見つかった。それらは、-65C>A (アレル頻度 0.5%) および -32G>A (アレル頻度 0.5%) であり、-65C>A は今までに報告されていない変異であった。

2-7) MRP2

-24C>T の rSNP のアレル頻度は 20.6%であった。また、この変異をヘテロあるいはホモで有する患者と、この変異をもたない患者の MRP2 mRNA 発現量にはほとんど差がみられなかった (Fig. 2)。従って、-24C>T は MRP2 mRNA 発現量には影響を及ぼさないことが示唆された。

3) 薬物トランスポータの発現量に及ぼす因子の探索

今回発現量の定量を行った 18 種類の薬物トランスポータについて、肝炎ウイルス感染及び肝硬変が薬物トランスポータの発現量に影響を及ぼすか否かについて調べた。また、ICG 消失率と、ICG の輸送に関与すると考えられるトランスポータの発現量の関連についても調べた。

3-1) 肝炎ウイルス

今回発現プロファイルを作成した 105 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 (49 名)、HBV 陽性群 (10 名)、HCV 陽性群 (46 名) 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。その結果、HCV 陽性群にお

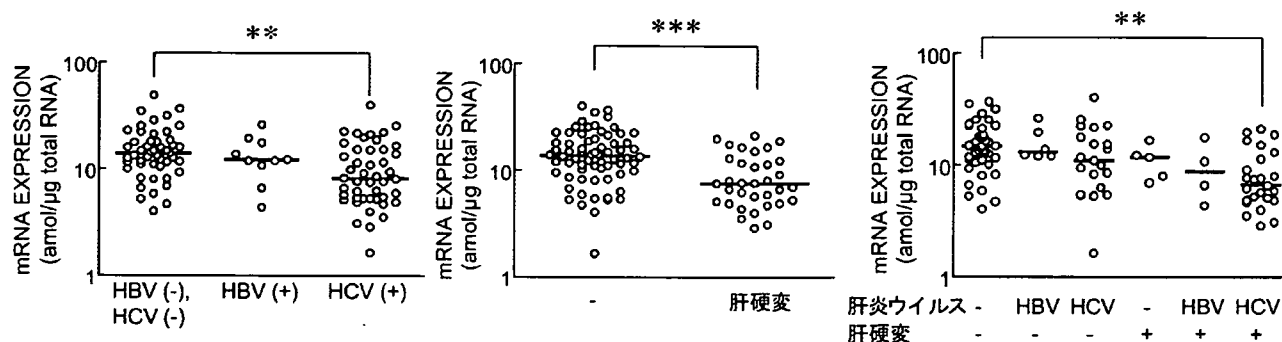
いて、SLC トランスポータでは OCT1、OATP1B1、OATP1B3、MATE1 の発現量が、ABC トランスポータでは MRP2 及び BCRP の発現量が、HBV 及び HCV 陰性群に比べて有意に低下することが明らかになった。一方、ABC トランスポータである MDR1、MRP1 及び MRP4 の発現量は、HBV 及び HCV 陰性群と比較して、HCV 陽性群において有意に上昇した (Fig. 3)。HBV 感染の薬物トランスポータ発現に及ぼす影響は観察されなかった。

3-2) 肝硬変

今回発現プロファイルを作成した 105 名のうち、肝硬変と診断された患者は 34 名だった。非肝硬変群 (71 名) と比較して、肝硬変群では 9 種類の薬物トランスポータの発現量が有意に低下した。この薬物トランスポータとは、HCV 陽性群において有意に発現が低下した 6 種類の薬物トランスポータ (OCT1、OATP1B1、OATP1B3、MATE1、MRP2、BCRP) 及び OATP2B1、MRP3、MRP6 であった。一方、MRP4 の発現量は肝硬変群で有意に上昇した (Fig. 3)。MDR1 及び MRP1 の発現量も非肝硬変群に比べ、肝硬変群で上昇傾向を示したが、有意差は検出されなかった。

非肝硬変群及び肝硬変群をさらに、肝炎ウイルス感染の有無で群分けしたところ、HBV 及び HCV 陰性かつ非肝硬変群に比べて、HCV 陽性かつ肝硬変群において 6 種類の薬物トランスポータ (OCT1、OATP1B1、OATP1B3、MATE1、MRP2、BCRP) の発現量が有意に低下し、MDR1、MRP1 及び MRP4 の発現量が有意に上昇した (Fig. 3)。

(A) OCT1



(B) MRP4

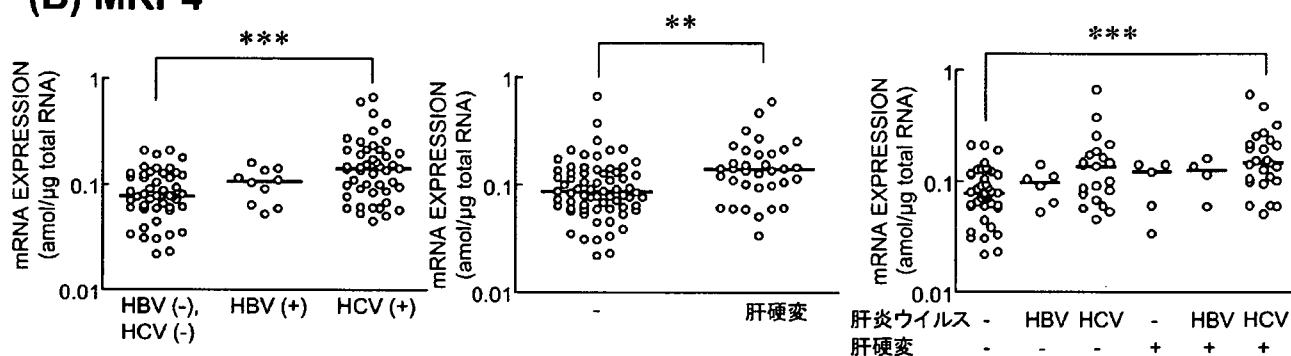


Fig. 3. 肝薬物トランスポータ発現量に及ぼす肝炎ウイルス感染、肝硬変の影響

(A) OCT1、(B) MRP4 (**: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$)

3-3) ICG 消失率

ICG はアニオン性の色素で、肝細胞に特異的に取り込まれた後、未変化体のまま胆汁中に排泄される。そこで、肝臓においてアニオン性薬物の輸送を媒介している OAT ファミリー、OATP ファミリー、そして MRP2 に着目し、これらトランスポータの発現量と ICG 消失率との関連を検討した。ICG 消失率については、高い群 (0.168 以上)、中間群 (0.1 以上 0.168 未満)、低い群 (0.1 未満) に分けて、比較解析を行った。OATP1B1、OATP1B3、MRP2 の発現量は、ICG 消失率が高くなるにつれて、有意な上昇を示した (Fig. 4)。OAT2、OAT7、OATP2B1 の発現量は、ICG 消失率と有意な相関を示さなかった。

D. 考察

肝臓における SLC 並びに ABC トランスポータ (合計 18 種類) の発現解析を行ったところ、SLC トランスポータでは OATP2B1 > OCT1 > OAT2 >

OATP1B1 > OATP1B3 > 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、発現量の大きさはこのような機能的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機能していることが推察される。

rSNP 解析の結果、OCT1、OAT2、OATP1B3、MATE1 では頻度の高い遺伝子多型は認められず、mRNA 発現量に及ぼす影響も調べることは出来なかった。ま