

た、これまでに MRP2/ABCC2 の 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 rSNP (-24C>T) は高頻度に認められたが、本研究では有意な影響は認められなかった。むしろ、MRP2 の発現には後述する肝炎ウイルス感染や肝硬変の有無が大きな影響を与えていることが判明し、rSNP の影響はそれほど大きくないことが考えられる。一方、OATP2B1 の-282A>G を有する患者では有意に mRNA 発現量が低下し、またハプロタイプ解析でも同様の傾向が認められた。OATP2B1 は高脂血症治療薬であるアトルバスタチンを特異的に輸送することが知られており (Clin. Pharmacol. Ther., 80, 607-620, 2006)、本研究において同定した rSNP はアトルバスタチンの PK/PD に影響を及ぼす可能性が考えられる。

薬物トランスポーター発現量に及ぼす肝炎ウイルス及び肝硬変の影響を調べたところ、HCV 陽性群と肝硬変群において、同じ薬物トランスポーターが同様の発現変動の挙動を示した (減少: OCT1、OATP1B1、OATP1B3、MATE1、MRP2、BCRP、増加: MDR1、MRP1、MRP4)。これは、C 型肝炎と肝硬変が密接に関連していることを示唆するものであり、実際に肝硬変の主な原因は C 型肝炎であることが知られている。そこで、肝炎ウイルス及び肝硬変の情報を組み合わせて、発現量の比較解析を行ったところ、HCV 陰性かつ非肝硬変群と HCV 陽性かつ肝硬変群の間においてのみ、上記薬物トランスポーターの有意な発現の変動が認められた。以上より、C 型肝炎に起因

する肝硬変患者では、OCT1、OATP1B1、OATP1B3、MATE1、MRP2、BCRP の発現が減少し、一方 MDR1、MRP1、MRP4 の発現が増加することが明らかとなった。C 型肝炎に起因する肝硬変患者へ薬物療法を行う時に、上記薬物トランスポーターによって輸送される薬物を投与する際は、正常時に比べて体内動態が変化する可能性があることを考慮に入れる必要がある。

肝機能検査薬である 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。肝機能低下時には、ICG 消失率は低下する。ICG の肝細胞内への取り込み及び胆汁中への排泄は薬物トランスポーターによって媒介されていると考えられているが、どのトランスポーターが関与するかについては不明である。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ーの発現量と ICG 消失率との関連について検討した。その結果、OATP1B1、OATP1B3、MRP2 の発現量が、ICG 消失率が高くなるにつれて、有意に上昇する傾向を示した。このことは、これら 3 種類のトランスポーターが ICG の輸送に関与している可能性を示している。一方、これら 3 種類のトランスポーターは C 型肝炎に起因する肝硬変において有意に発現が低下する薬物トランスポーターである。今回の解析対象では、C 型肝炎に起因する肝硬変患者では ICG 消失率が低下していた。血中からの ICG の消失は主に肝血流に依存し

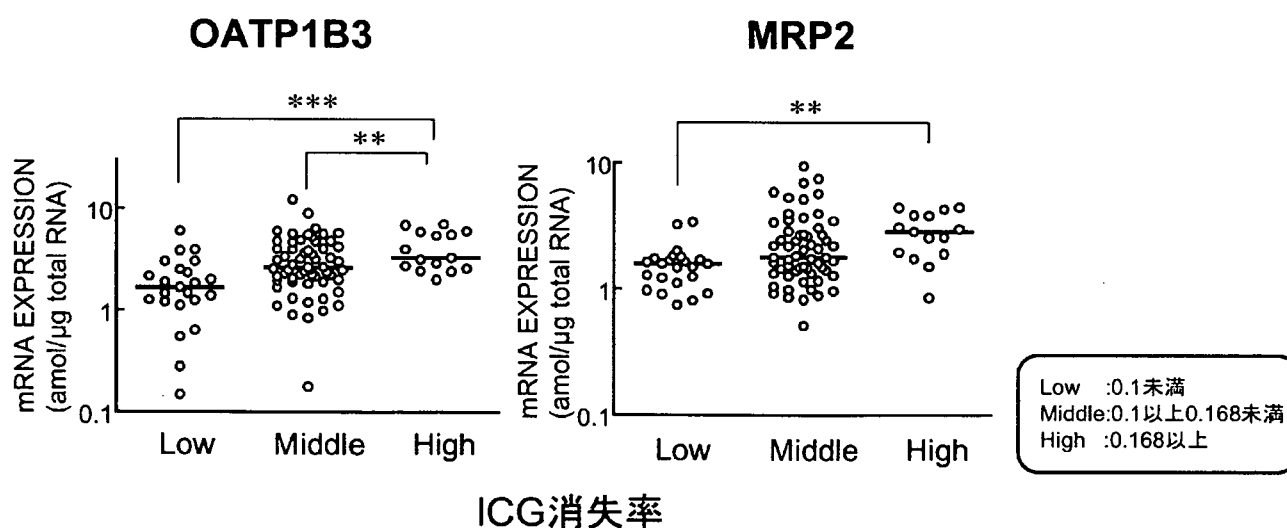


Fig. 4. 肝薬物トランスポーター発現量と ICG 消失率との関連 (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

ており、肝硬変による肝血流量の低下が ICG 消失率の低下の主原因と考えられる。しかしながら、OATP1B1、OATP1B3、MRP2 すべて若しくはいずれかの発現量が低下することが ICG 消失率の低下に一部寄与している可能性も考えられる。

E. 結論

肝臓では SLC トランスポータのうち、OATP2B1、OCT1、OAT2、OATP1B1、OATP1B3、MATE1 が高発現していた。一方、MRP2 など ABC トランスポータの発現量は、SLC トランスポータに比べて少なかった。上記 7 種類の薬物トランスポータの rSNP 解析を実施し、OATP2B1 の mRNA 発現量を低下させる rSNP (-282A>G) を同定した。また、C 型肝炎ウイルス陽性かつ肝硬変と診断された患者では、OCT1 等 6 種類の薬物トランスポータの発現が減少し、MRP4 等 3 種類の薬物トランスポータの発現が増加することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

得られた成果の中に健康被害情報に該当するものはない。

G. 研究成果発表

1. 論文発表

1. Ninagawa, M., Ikai, I., Matsuyama, Y., Yamaoka, Y. and Makuuchi, M.: Staging of hepatocellular carcinoma: assessment of the Japanese TNM and AJCC/UICC TNM systems in a cohort of 13,772 patients in Japan. *Ann. Surg.* **245**(6), 909-922 (2007)
2. Makuuchi, M., Kokudo, N., Arii, S., Futagawa, S., Kaneko, S., Kawasaki, S., Matsuyama, Y., Okazaki, M., Okita, K., Omata, M., Saida, Y., Takayama, T. and Yamaoka, Y.: Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatol. Res.* **38**(1), 37-51 (2008)

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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

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。これら腎臓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は未だ不明の点が多い。また最近、遺伝子の発現制御機構の一つとして、DNA のメチル化などエピジェネティックな調節が注目されている。昨年度は、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、両トランスポータの分子情報を収集すると共に、MATE1 遺伝子の転写活性を低下させる rSNP (-32G>A) を同定した。本年度は、MATE2-K 遺伝子のプロモーター解析と rSNP の検索を行なうと共に、臓器特異的な発現を示す膜電位依存性有機カチオントランスポータ OCT1 (肝臓) と、OCT2 (腎臓) のエピジェネティックな制御について検討を加えた。Bisulfite sequencing、レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイなどの解析により、OCT2 の腎特異的な発現には、E-box を含む近位プロモーター領域のメチル化が寄与していることが示された。一方、OCT1 の肝特異的な発現にはプロモーター領域のメチル化は関与していなかった。デリションアナリシスやゲルシフトアッセイの結果、MATE2-K の基礎転写を、2 箇所の GC Box を介して Sp1 が規定していることが示された。また rSNP 解析の結果、-51C>T となる GC Box の多型 (アレル頻度は 36.5%) が見つかった。しかしこの rSNP は、MATE2-K のプロモーター活性や mRNA 発現量に影響を及ぼさなかった。これらの研究成果は、カチオン性薬物の腎動態の個人差を解明する上で有用な情報を提供すると考えられた。

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。昨年度までに、これら有機イオントランスポータの転写制御機構や rSNP の頻度やそのプロモーター活性に及ぼす影響

を明らかにしてきた。一方、ゲノム DNA のメチル化など、エピジェネティックな調節が遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしていることが、近年のゲノム研究によって明らかにされつつある。そこで、肝特異的な発現を示す OCT1 と腎特異的な発現を示す OCT2 について、プロモーター領域のメチル化状態を解析し、メチル化の転写制御に及ぼす影響を調べた。

また本厚生労働科学研究の成果の一環として、主任研究者乾らは、長年分子実体の不明であったヒト H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE1、MATE2-K) の分子実体を明らかにした。昨年度は、両トランスポータの薬物輸送特性、ヒト腎における発現量を調

べ、さらに *MATE1* 遺伝子のプロモーター解析や rSNP 解析を実施した。そこで今年度は、情報の乏しい *MATE2-K* 遺伝子の転写制御機構や rSNP について検討を加えた。

B. 研究方法

1) OCT1 及び OCT2 プロモーター領域のメチル化解析

腎がんあるいは肝臓と診断され、摘出術を施行された患者から得られた腎臓あるいは肝臓の正常部からゲノム DNA を調製した。Bisulfite sequencing により、OCT1 または OCT2 遺伝子の近位プロモーター領域の各 CpG サイトのメチル化の状態について調べた。また USF1 結合領域 (E-box) を含む OCT2 のレポーターコンストラクトを *in vitro* でメチル化し、培養腎上皮細胞 LLC-PK₁ を用いたルシフェラーゼアッセイにより転写活性に対するメチル化の影響について検討した。さらに、E-box 内の CpG サイトを特異的にメチル化したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いたゲルシフトアッセイにより、USF1 の結合に及ぼすメチル化の影響を調べた。

2) *MATE2-K* のプロモーター解析と rSNP 解析

MATE2-K のプロモーター領域として、転写開始部位から上流約 3 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。deletion construct 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、LLC-PK₁ 細胞に一過性に発現させ、ルシフェラーゼアッセイにより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って調べた。また腎不全患者 (N=89) のゲノム DNA を精製し、*MATE2-K* 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シングを行った。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、ルシフェラーゼ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。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) OCT1 及び OCT2 プロモーター領域のメチル化解析

OCT1 と OCT2 の臓器分布に関する解析の結果、OCT1 は肝特異的に、また OCT2 は腎特異的に発現していることが示されている。一方、昨年度の本研究によって、両トランスポータの基礎転写には、ユビキタスな発現分布を示す USF1 が関与していることが明らかとなった。従って、両トランスポータの組織特異的な発現を、転写因子によって説明することは困難である。そこで、エビジェネティックな制御、すなわちゲノム DNA のメチル化に着目し検討を加えた。

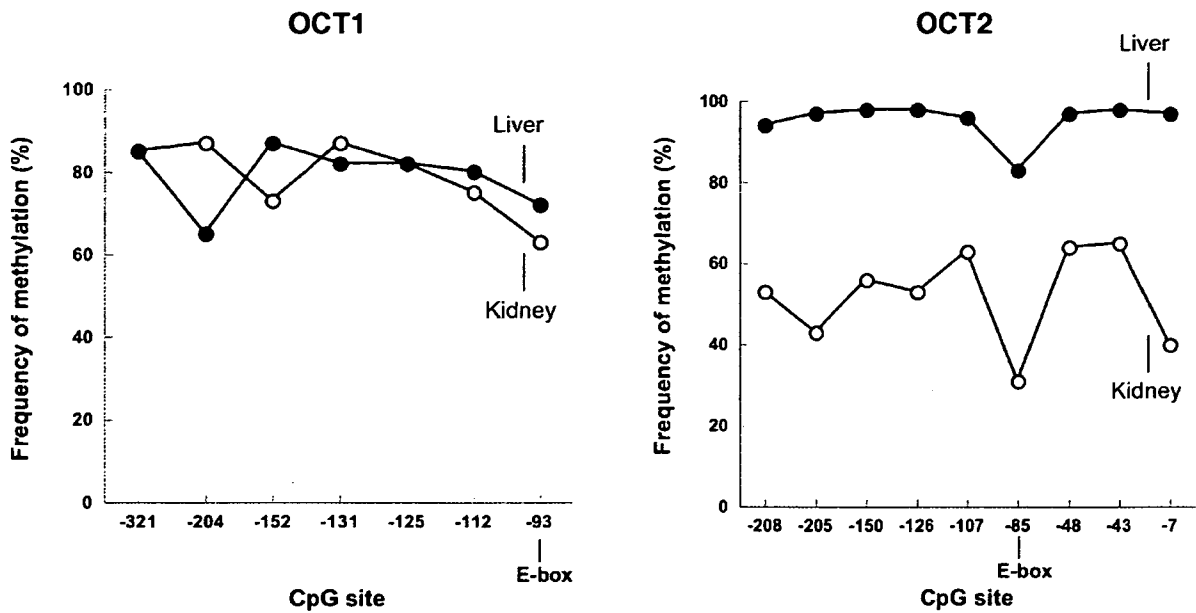


Fig. 1. 腎臓及び肝臓における *OCT1* 及び *OCT2* 遺伝子の近位プロモーター領域の CpG メチル化の割合

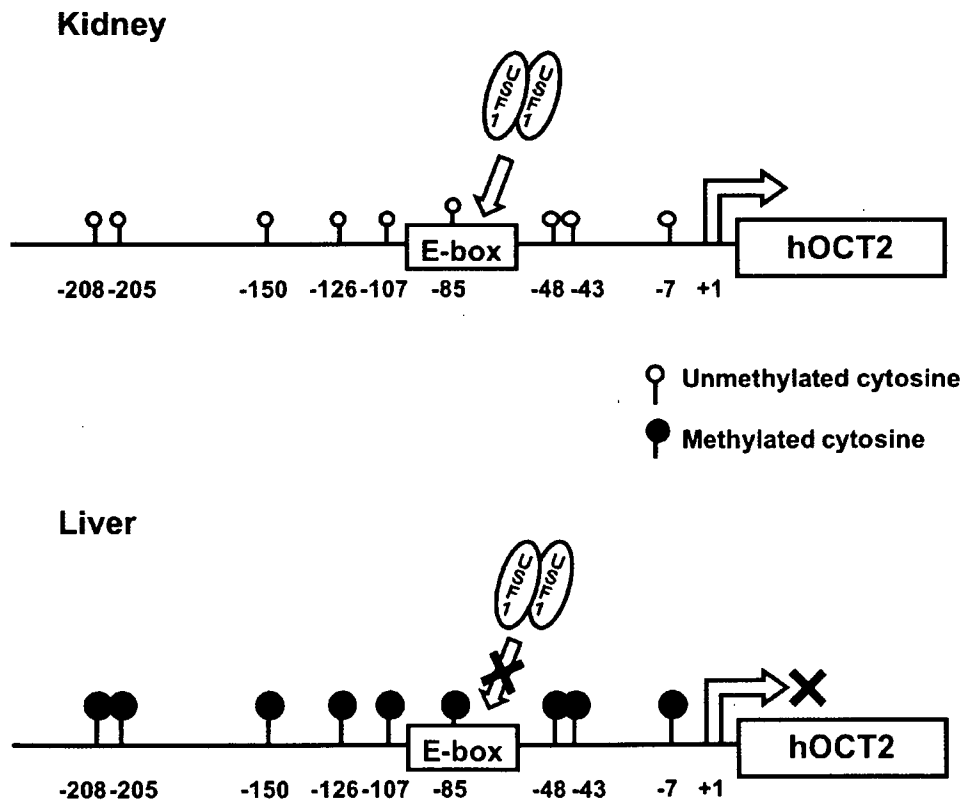


Fig. 2. *OCT2* 遺伝子の腎特異的な発現に及ぼすメチル化の影響. 基礎転写因子 (USF1) の結合部位のメチル化頻度が腎臓では低いため、USF1 が結合し遺伝子発現が認められる。

1-1) OCT1

肝臓及び腎臓から精製したゲノム DNA を用いて、*OCT1* 遺伝子の近位プロモーター領域（約 300 bp）のメチル化状態を両臓器間で比較した。その結果、この領域に存在する 7カ所の CpG サイトは、肝臓と腎臓いずれにおいても高頻度にメチル化されており、組織特異的なメチル化状態は認められなかった (Fig. 1)。従って、プロモーター領域のメチル化は *OCT1* の肝特異的な発現には関与していないことが示唆された。

1-2) OCT2

次に、*OCT1* と同様の解析を、*OCT2* 遺伝子の近位プロモーター領域（約 250 bp）について解析を加えた。その結果、この領域に存在する 9カ所の CpG サイトのメチル化状態は、肝臓と腎臓で大きく異なっており、肝臓ではいずれの CpG サイトも高頻度にメチル化されていたのに対し、腎臓ではメチル化の程度は低かった (Fig. 1)。特に、*OCT2* 遺伝子の基礎転写を制御する *USF1* が結合する E-box のメチル化されている割合は、腎臓では極めて低かった。

次にメチル化のプロモーター活性に及ぼす影響について検討を加えた。ルシフェラーゼアッセイの結果、E-box を含む近位プロモーター領域のメチル化によってプロモーター活性の著しい低下が認められた。また、ゲルシフトアッセイでは、E-box 内の CpG サイトのメチル化によって *USF1* の E-box への結合が阻害されることが明らかになった。従って、肝臓では *hOCT2* の近位プロモーター領域が高頻度にメチル化されることによって *USF1* の結合が阻害され、

転写が抑制されていること、また腎臓の近位プロモーター領域は低メチル化状態にあるため、*USF1* が E-box を介し転写を活性化していることが示唆された (Fig. 2)。

2) *MATE2-K* のプロモーター解析と rSNP 解析

昨年度は、*MATE1* の基礎転写には *Sp1* が関与し、*Sp1* 結合部位の rSNP (-32G>A) によって、*MATE1* のプロモーター活性が低下することを報告した。そこで、今年度は *MATE2-K* 遺伝子の基礎転写を制御しているシスエレメントやトランス因子の探索を試みた。

deletion analysis の結果、プロモーター領域 -90~-69 bp と -69~-48 bp を欠損させることによって、段階的にプロモーター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、いずれの領域にも *Sp1* 推定結合領域 (GC box) が存在した。*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単独に変異を導入しても、顕著なプロモーター活性の減少は認められなかったが、同時に変異を導入すると、プロモーター活性はほぼ完全に消失した。従って、2つの *Sp1* 結合部位が協調して転写活性を制御していることが示唆された。また、ゲルシフトアッセイによりそれぞれの GC box に *Sp1* の結合することが明らかとなった。

MATE2-K の rSNP 解析を行ったところ、-51 位の C が T 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 36.5%であった。この rSNP の基礎転写に及ぼす影

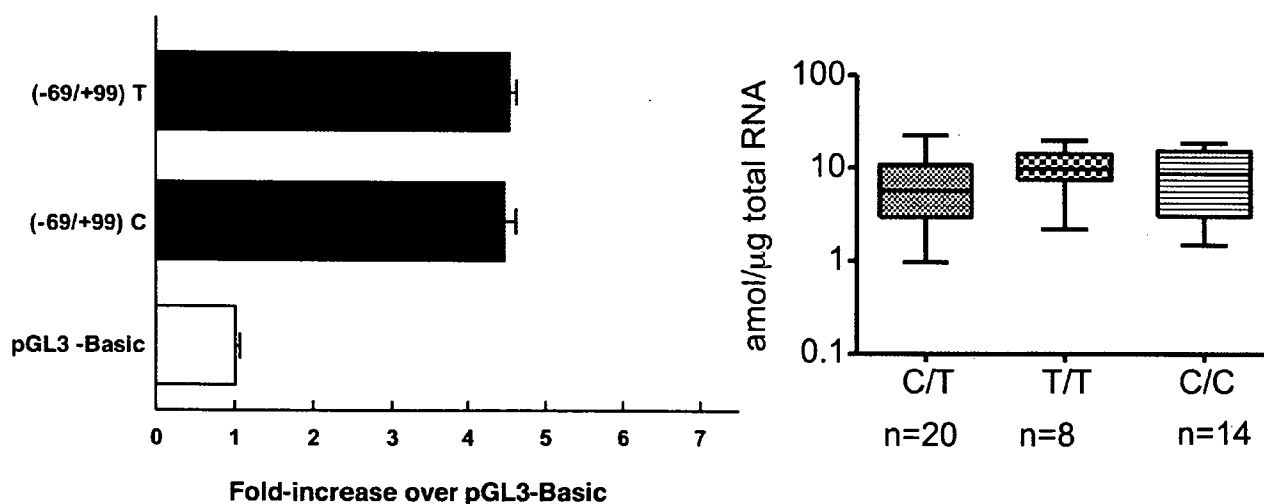


Fig. 3. rSNP (-51C>T)の *MATE2-K* のプロモーター活性 (左) 並びに mRNA 発現量 (右) に及ぼす影響

響を調べたところ、wild type と同程度のプロモーター活性を示した (Fig. 3)。またこの rSNP の MATE2-K mRNA 発現量に及ぼす影響を調べたところ、いずれの遺伝子型もほぼ同程度の発現量を示した。従って、MATE2-K 遺伝子の rSNP (-51C>T) は、MATE2-K の転写活性に影響を与えないことが示唆された (Fig. 3)。

D. 考察

カチオン性薬物の尿細管分泌は、近位尿細管上皮細胞の側底膜における取り込みと刷子縁膜における排出の機能的連関によって営まれている。側底膜側では、膜電位依存性の有機カチオントランスポーター (OCT2) が、また刷子縁膜では、H⁺/有機カチオンアンチポーター (MATE1、MATE2-K) が発現し、輸送を制御している。OCT2 の基礎転写機構やプロモーター領域の多型については、昨年度までに解析が終了し、OCT2 の発現量に影響を及ぼす可能性のある遺伝子多型 (-578_-576delAAG) を同定した。しかし、本多型のみで OCT2 の発現量の個体差を説明することは困難である。発現量を制御する因子の候補として、エピジェネティックな制御も考えられることから、OCT2 の腎特異的な発現にプロモーター領域のメチル化が関与しているか否かについて検討を加えた。併せて、OCT2 のアイソフォームである OCT1 の肝特異的な発現に対するメチル化の影響も調べた。

Bisulfite sequencing、ルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイなどの解析により、OCT2 の腎特異的な発現には、E-box を含む近位プロモーター領域のメチル化が関与することが示された。これまで臓器特異的な遺伝子発現に、メチル化が関与していることは、HP-27 (Biochem. J., 395, 203-209, 2006)、AQP-5 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 353, 1017-1022, 2007)、Abcc6 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 354, 66-71, 2007) などで報告されている。メチル化による転写抑制のメカニズムとしては、1) 転写因子の認識配列およびその隣接領域のメチル化による直接的な結合阻害、2) メチル化 CpG 結合タンパクの結合に伴うクロマチン構造の凝集による転写装置の結合阻害、の 2 つが考えられる。OCT2 では、E-box だけではなくその周辺の CpG サイトのメチル化状態も腎臓では低頻度であったことから、これら 2 つのメカニズムの両方が関与していると考えられる。腎臓での OCT2 プロモーター領域のメチル化状態には個体差がみられた。このメチル化の頻度が OCT2 の発現量の個体差を生じる因子となり得る

かについては、今後さらなる検討が必要と考えられる。

OCT1 は肝特異的に発現し、その基礎転写は E-box を介し USF1 および USF2 によって制御されている。OCT2 とは異なり、OCT1 の近位プロモーター領域のメチル化状態は肝臓と腎臓で極めて類似していた。これまで、OCT1 のプロモーター活性は、肝臓で高い発現がみられる転写因子 HNF4 α によって制御されることが報告されている (J. Pharmacol. Exp. Ther., 312, 7778-7785, 2006)。従って、OCT1 の肝特異的な発現にはメチル化は関与せず、臓器特異的な転写因子による調節が寄与しているものと推察された。

最近分子同定された刷子縁膜側の有機カチオントランスポーター (MATE1、MATE2-K) の基本的な分子特性は、昨年度の本研究の成果によって明らかにされた。さらに MATE1 の基礎転写には、Sp1 が関与し、Sp1 結合領域に rSNP (-32G>A) を見出した。この rSNP によってプロモーター活性が約 50%低下する。しかし、MATE2-K の転写制御機構については不明であったため、本研究において検討を加えた。その結果、MATE2-K の基礎転写も MATE1 と同様に、Sp1 によって調節されていることが、一連の *in vitro* の解析によって明らかになった。またアレル頻度が 36.5%と高い rSNP (-51C>T) を見出したが、この rSNP はプロモーター活性や mRNA の発現量に影響を及ぼさなかった。主任研究者乾が実施した糖尿病治療薬メトホルミン (MATE1、MATE2-K の基質) の臨床薬物動態解析においても、rSNP (-51C>T) は、現在のところメトホルミンの消失半減期に影響を及ぼさないことが示されている。

E. 結論

OCT2 の腎特異的な発現には、プロモーター領域のメチル化が大きく関与していること、特に E-box 内の CpG サイトのメチル化が、重要な役割を果たしていることを初めて実証した。一方、OCT1 の肝特異的な発現にはプロモーター領域のメチル化は関与していないことが示された。また、MATE2-K の基礎転写には、MATE1 と同様に Sp1 が関与していることが判明したが、Sp1 結合部位の rSNP (-51C>T) は遺伝子発現に影響を与えないことが示された。本研究では、OCT2 や MATE2-K など腎薬物トランスポーターの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解明していく上で重要な基礎的知見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. Takahashi, K., Yano, I., Fukuhara, Y., 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)
2. Kanatani, I., Kanematsu, A., Inatsugu, Y., Imamura, M., Negoro, H., Ito, N., Yamamoto, S., Tabata, Y., Ikada, Y. and Ogawa, O.: Fabrication of an optimal urethral graft using collagen-sponge tubes reinforced with Copoly(L-lactide/epsilon-caprolactone) fabric. *Tissue Eng.*, **13**(12), 2933-2940 (2007)
3. 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 antiporter MATE1. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **293**(5), F1564-F1570 (2007)
4. Inoue, T., Nishiyama, H., Yoshimura, K., Ito, N., Kamoto, T., Habuchi, T. and Ogawa, O.: Solitary upper ureteral malakoplakia successfully diagnosed by ureteroscopic biopsy and treated conservatively. *Int. J. Urol.*, **14**(9), 859-861 (2007)
5. Kobayashi, T., Goto, R., Fukui, T. and Ogawa, O.: Impact of improvement in specificity of primary screening test on total cost of prostate cancer mass screening. *Int. J. Urol.*, **14**(9), 805-810 (2007)
6. 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)
7. Sawai, K., Mukoyama, M., Mori, K., Kasahara, M., Koshikawa, M., Yokoi, H., Yoshioka, T., Ogawa, Y., Sugawara, A., Nishiyama, H., Yamada, S., Kuwahara, T., Saleem, MA., Shiota, K., Ogawa, O., Miyazato, M., Kangawa, K. and Nakao, K.: Expression of CCN1 (CYR61) in developing, normal, and diseased human kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **293**(4), F1363-F1372 (2007).
8. Kanematsu, A., Yamamoto, S. and Ogawa, O.: Changing concepts of bladder regeneration. *Int. J. Urol.*, **14**(8), 673-678 (2007)
9. Awakura, Y., Nakamura, E., Ito, N., Yamasaki, T., Kamba, T., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Influence of body mass index on prognosis of Japanese patients with renal cell carcinoma. *Urology*, **70**(1), 50-54 (2007).
10. Ito, M., Nishiyama, H., Kawanishi, H., Matsui, S., Guilford, P., Reeve, A. and Ogawa, O.: P21-activated kinase 1: a new molecular marker for intravesical recurrence after transurethral resection of bladder cancer. *J. Urol.*, **178**(3 Pt 1), 1073-1079 (2007)
11. Imamura, M., Kanematsu, A., Yamamoto, S., Kimura, Y., Kanatani, I., Ito, N., Tabata, Y. and Ogawa, O.: Basic fibroblast growth factor modulates proliferation and collagen expression in urinary bladder smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **293**(4), F1007-F1017 (2007)
12. Ito, N., Eto, M., Nakamura, E., Takahashi, A., Tsukamoto, T., Toma, H., Nakazawa, H., Hirao, Y., Uemura, H., Kagawa, S., Kanayama, H., Nose, Y., Kinukawa, N., Nakamura, T., Jinnai, N., Seki, T., Takamatsu, M., Masui, Y., Naito, S. and Ogawa, O.: STAT3 polymorphism predicts interferon-alfa response in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **25**(19), 2785-2791 (2007)
13. Yoshimura, K., Kamoto, T., Oka, Y., Tsukamoto, T., Oshiro, K., Suzukamo, Y., Kinukawa, N. and Ogawa, O.: Differences between bothersome and non-bothersome night-time frequency. *NeuroUrol. Urodyn.*, **26**(7), 1014-1019 (2007)
14. Kawanishi, H., Takahashi, T., Ito, M., Matsui, Y., Watanabe, J., Ito, N., Kamoto, T., Kadowaki, T., Tsujimoto, G., Imoto, I., Inazawa, J., Nishiyama, H. and Ogawa, O.: Genetic analysis of multifocal superficial urothelial cancers by array-based

- comparative genomic hybridisation. *Br. J. Cancer*, **97**(2), 260-266 (2007)
15. Shang, D., Liu, Y., Ito, N., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Defective Jak-Stat activation in renal cell carcinoma is associated with interferon-alpha resistance. *Cancer Sci.*, **98**(8), 1259-1264 (2007)
 16. Shimizu, Y., Segawa, T., Inoue, T., Shiraishi, T., Yoshida, T., Toda, Y., Yamada, T., Kinukawa, N., Terada, N., Kobayashi, T., Kinoshita, H., Kamoto, T., Nakamura, E. and Ogawa, O.: Increased Akt and phosphorylated Akt expression are associated with malignant biological features of prostate cancer in Japanese men. *BJU Int.*, **100**(3), 685-690 (2007)
 17. 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)
 18. Shang, D., Ito, N., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine enhances susceptibility of renal cell carcinoma to paclitaxel. *Urology*, **69**(5), 1007-1012 (2007)
 19. Yoshimura, K., Kamoto, T., Tsukamoto, T., Oshiro, K., Kinukawa, N. and Ogawa, O.: Seasonal alterations in nocturia and other storage symptoms in three Japanese communities. *Urology*, **69**(5), 864-870 (2007)
 20. 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)
 21. 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.*, **52**(4), 1131-1139 (2007)
 22. Kato, M., Takeda, A., Saito, S., Terai, A., Taki, Y., Kato, S., Okada, Y., Ogawa, O. and Arai, Y.; Tohoku-Kyoto Urinary Reconstruction Study Group.: Long-term functional outcomes of ileal and sigmoid orthotopic neobladder procedures. *Urology*, **69**(1), 74-77 (2007)
 23. 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*, **23**(6), 732-738 (2007)
 24. Yoshimura, K., Kamoto, T., Nakamura, E., Segawa, T., Kamba, T., Takahashi, T., Nishiyama, H., Ito, N., Takayama, K., Mizowaki, T., Mitsumori, M., Hiraoka, M. and Ogawa, O.: Health-related quality-of-life after external beam radiation therapy for localized prostate cancer: intensity-modulated radiation therapy versus conformal radiation therapy. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **10**(3), 288-292 (2007)
 25. 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

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Terada and Inui	Impact of drug transport proteins.	Ehrhardt, C. and Kim, K.J.	Drug Absorption Studies - In Situ, In Vitro and In Silico Models	Springer	New York	2008	pp. 559-576
寺田智祐、乾賢一	H ⁺ /有機カチオンアンチポータ(MATE/SLC47A)	御手洗哲也、東原英二、秋澤忠男、五十嵐隆、金井好克	Annual Review 腎臓 2008	中外医学社	東京	2008	pp. 36-42

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
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.	73(9)	1482-1490	2007
Matsuzaki et al.	Downregulation of organic anion transporters in rat kidney under ischemia/reperfusion-induced acute renal failure.	Kidney Int.	71(6)	539-547	2007
Asaka et al.	Characterization of the basal promoter element of human organic cation transporter 2 (hOCT2) gene.	J. Pharmacol. Exp. Ther.	321(2)	684-689	2007
Asaka et al.	Identification of essential histidine and cysteine residues of H ⁺ /organic cation antiporter, Multidrug and Toxin Extrusion (MATE).	Mol. Pharmacol.	71(6)	1487-1493	2007
Ogasawara et al.	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
Uwai et al.	Interaction and transport characteristics of mycophenolic acid and its	Biochem. Pharmacol.	74(1)	161-168	2007

	glucuronide via human organic anion transporters hOAT1 and hOAT3.				
Tanihara et al.	Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H ⁺ -organic cation antiporters.	Biochem. Pharmacol.	74(2)	359-371	2007
Yokoo et al.	Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agents-induced nephrotoxicity.	Biochem. Pharmacol.	74(3)	477-487	2007
Ueo et al.	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
Jiko et al.	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
Kajiwara et al.	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
Matsuzaki et al.	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
Nakagawa et al.	Roles of organic anion transporters in the renal excretion of perfluorooctanoic acid.	Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.	in press		
Nishio et al.	Thyroid hormone regulates the expression and function of P-glycoprotein in Caco-2 cells.	Pharm. Res.	in press		
Terada and Inui	Physiological and pharmacokinetic roles of H ⁺ /organic cation antiporters (MATE/SLC47A).	Biochem. Pharmacol.	in press		
Ogasawara et al.	Analyses of regulatory polymorphisms in organic ion transporter genes (SLC22A) in the kidney.	J. Hum. Genet.	in press		

Impact of Drug Transport Proteins

Tomohiro Terada and Ken-ichi Inui

Abstract Drug transporters play critical roles in the absorption, distribution, and excretion of drugs and have been classified into five major families, peptide transporters (PEPT, SLC15), organic anion-transporting polypeptides (OATP, SLCO), organic ion transporters (OCT/OCTN/OAT/URAT, SLC22), H⁺/organic cation antiporters (MATE, SLC47), and ABC drug transporters, such as P-glycoprotein (P-gp/MDR1, ABCB1). Their structures, tissue distribution, functions, and pharmacokinetic roles vary. The roles of drug transporters can be assessed *in vitro* and *in vivo*, using techniques spanning from cellular expression systems to gene knockout animals. Research outcomes from such studies have been applied to clinical science and drug development. In this chapter, the basic characteristics of drug transporters were reviewed with an emphasis on their impact on clinical/preclinical research.

Abbreviations

ABC	ATP-binding cassette
ACR	Acute cellular rejection
BCRP	Breast cancer resistance protein
BSEP	Bile salt export pump
CYP	Cytochrome P450
GFR	Glomerular filtration rate
HGNC	Human Gene Nomenclature Committee
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
LDLT	Living-donor liver transplantation
MATE	Multidrug and toxin extrusion
MDR	Multidrug resistance protein
MRP	Multidrug resistance-associated protein
NBD	Nucleotide-binding domain
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion-transporting polypeptide
OCT	Organic cation transporter
OCTN	Novel organic cation transporter
PAH	P-aminohippurate
PCR	Polymerase chain reaction

PEPT	H ⁺ /peptide cotransporter
P-gp	P-glycoprotein
SLC	Solute carrier
SNP	Single nucleotide polymorphism
SUR	Sulfonylurea receptor
TEA	Tetraethylammonium
TM	Transmembrane
URAT	Urate transporter

Keywords: Drug transporter; SLC-transporter; ABC transporter; Drug delivery; Intestinal absorption barrier

23.1. Introduction

Drug efficacy and safety are determined by the interplay of multiple processes that regulate pharmacokinetics (e.g., absorption, distribution, metabolism, and excretion) and pharmacodynamics (e.g., drug action). For orally administered drugs, pharmacologic action is dependent on an adequate intestinal absorption and distribution before elimination via metabolic and excretory pathways. Drug-metabolizing enzymes have been believed to be the key determinants of pharmacokinetics. The membrane transport processes are also recognized as important to pharmacokinetic properties, but classical analyses were mainly performed *in vivo* or in excised tissues, mostly lacking *in vitro* methodologies to precisely evaluate the membrane transport characteristics of drugs.

In the early 1980s, studies of membrane vesicles and cultured epithelial cell lines were introduced into the research field of drug transport and the biochemical characterization of drug transport advanced remarkably. For example, the driving force and substrate specificity of a drug transporter were clearly demonstrated using membrane vesicles, and transepithelial transport and regulatory aspects were characterized by using cultured cell lines. At the end of 1980s, the molecular nature of drug transporters was unveiled by cDNA cloning and the first clinically important drug transporter, the P-glycoprotein (P-gp), was identified. Subsequently, various primary and secondary active drug transporters were isolated by expression cloning, polymerase chain reaction (PCR) cloning, and *in silico* homology screening strategies. The most recently identified drug transporters are the renal H⁺/organic cation antiporters reported in 2005–2006. Although numerous drug transporters have been characterized so far, many others remain unidentified. For example, the molecular nature of the facilitative peptide transporters, which are located at the basolateral membranes of intestinal epithelial cells and are quite important for the transepithelial transport of peptide-like drugs, has not been elucidated.

Many drugs have been recognized to cross the intestinal epithelial cells via passive diffusion, thus their lipophilicity has been considered important. However, as described above, recent studies have demonstrated that a number of drug transporters including uptake and efflux systems determine the membrane transport process. In this chapter, we provide an overview of the basic characteristics of major drug transporters responsible not only for absorption but also for disposition and excretion in order to delineate the impact of drug transport proteins on pharmacokinetics.

23.2. Determination and Classification of Drug Transporters

Transporters have been functionally classified as primary and secondary active transporters. Primary active transporters include ATP-binding cassette (ABC) transporters that utilize the hydrolysis of ATP as a driving force. Secondary active transporters utilize various driving forces such as ion concentration gradients and electrical potential differences across cell membranes, according to the physicochemical properties of substrates and membrane localization of transporters. The Human Gene Nomenclature Committee (HGNC) has classified drug transporters based on sequence similarity as solute carriers (SLCs) and ABC transporters.

Although many members of the ABC and SLC families are categorized as drug transporters, because of their pharmacokinetic relevance and detailed characterization, only the following transporters are discussed in this chapter: peptide transporters (PEPT, SLC15), organic anion-transporting polypeptides (OATP, SLCO), organic ion transporters (OCT/OCTN/OAT/URAT, SLC22) and H⁺/organic cation antiporters (MATE, SLC47), P-glycoprotein (P-gp/MDR1, ABCB1), multidrug resistance-associated proteins (MRP2 and MRP3, ABCC), and breast cancer-resistance protein (BCRP, ABCG2). Secondary structures of these transporters are shown in Figure 23.1.

23.3. Characteristics of Major Drug Transporters

23.3.1. PEPT (SLC15)

23.3.1.1. Structure and Tissue Distribution

A cDNA encoding the H⁺/peptide cotransporter (PEPT1) was initially identified by expression cloning using a rabbit small intestinal cDNA library [1]. cDNA for the renal peptide transporter PEPT2 cDNA, an isoform of the intestinal PEPT1 has also been isolated [2]. PEPT1 and PEPT2 consist of 707–710 and 729 amino acid residues, respectively, and possess 12 transmembrane (TM) domains. The overall amino acid identity between them is ~50% [1–4]. PEPT1 is localized to brush-border membranes of intestinal and renal epithelial cells [5], whereas PEPT2 is preferentially expressed in the kidney and located at brush-border membranes of renal epithelial cells.

23.3.1.2. Function and Pharmacokinetic Roles

PEPT1 and PEPT2 can transport di- and tripeptides with different molecular sizes and charges, but not free amino acids and peptides composed of four or more peptide bonds [6]. Pharmacologically active peptide-like drugs such as β -lactam antibiotics, bestatin, and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors have been also reported to be transported by PEPT1 and PEPT2 [7]. It has been believed that the presence of peptide bonds is the most important factor in the recognition of substrates by peptide transporters. However, the structural requirements of PEPT1 and PEPT2 were reevaluated (most studies were performed with PEPT1), and it was demonstrated that even compounds without peptide bonds can be accepted as substrates (e.g., δ -amino levulinic acid [8], ω -amino fatty acid [9], and amino acid ester compounds [10–12]). Recently, a mathematical model of H⁺-coupled transport phenomena via PEPT1 was proposed [13, 14].

Over the last decade, PEPT1 has been utilized as a target for improving the intestinal absorption of poorly absorbed drugs through amino acid-based modifications. For example, the enhanced oral bioavailability of valacyclovir and valganciclovir, L-valine ester prodrugs of acyclovir and ganciclovir,

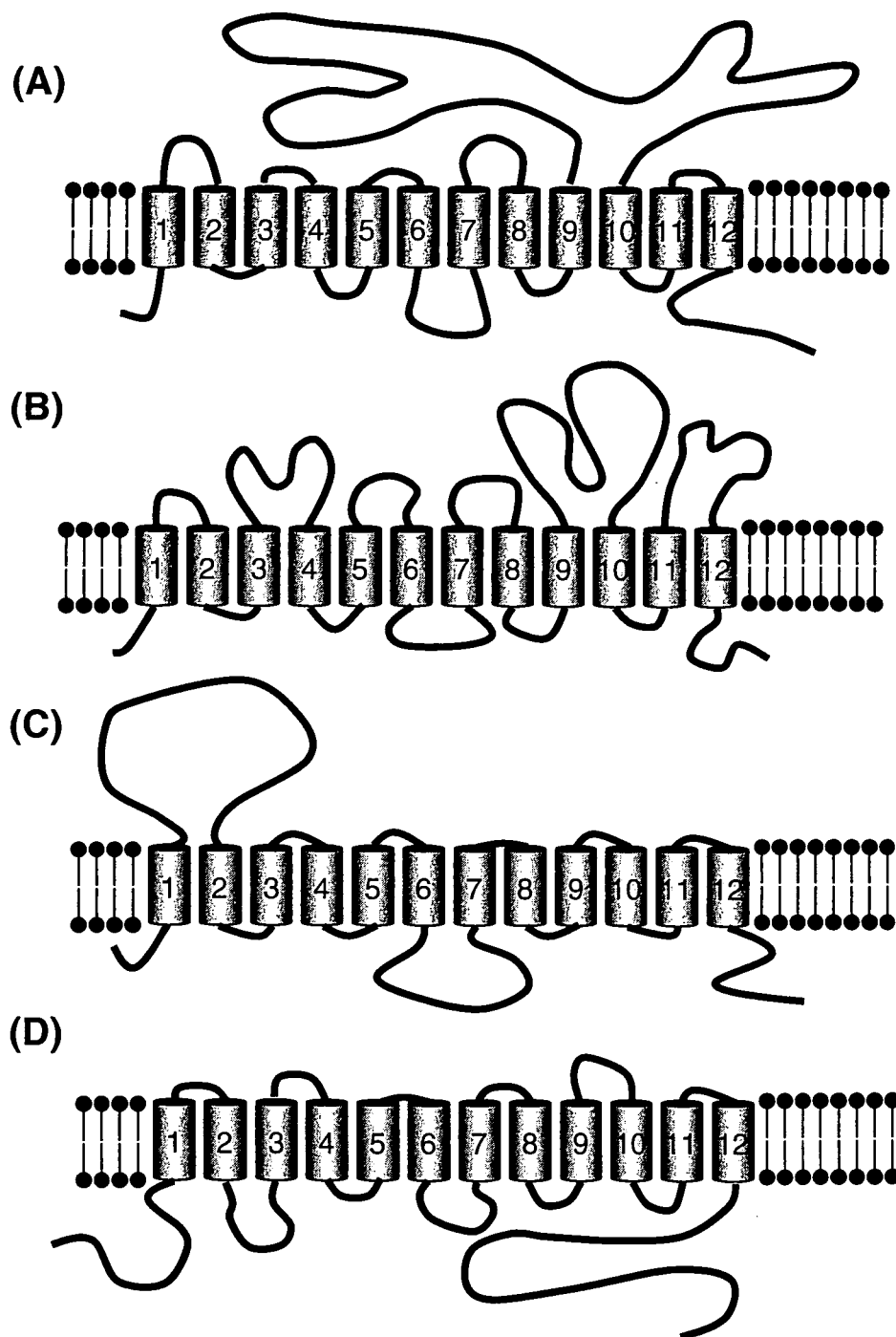


Figure 23.1 Putative secondary structures of various drug transporters. (A–D) Putative secondary structures of SLC drug transporters: (A) Peptide transporters (PEPT, SLC15), (B) Organic anion transporting polypeptides (OATP, SLCO), (C) Organic ion transporters (OCT/OCTN/OAT/URAT, SLC22), and (D) H^+ /organic cation antiporter (MATE). (E–G) Putative secondary structures of ABC drug transporters: (E) P-glycoprotein (P-gp/MDR1, ABCB1), (F) Multidrug resistance-associated proteins (MRP, ABCC), and (G) Breast cancer-resistance protein (BCRP, ABCG2).

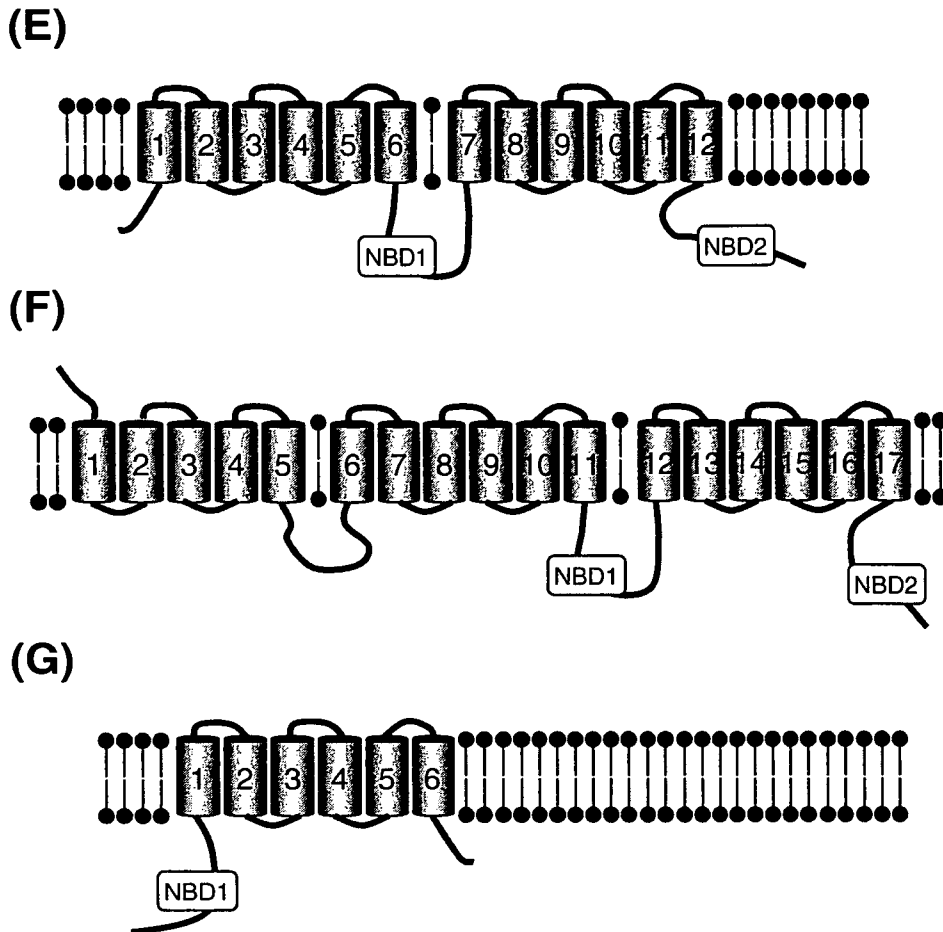


Figure 23.1 (Continued.)

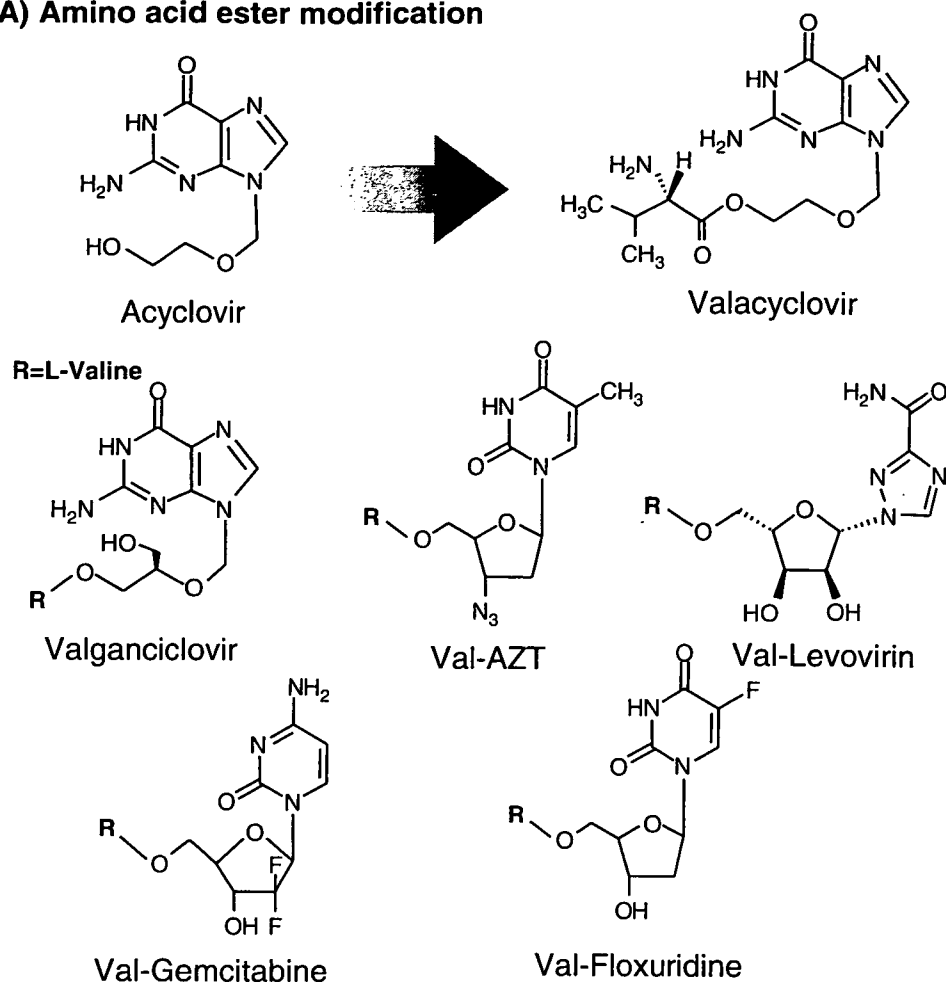
respectively, has been attributed to their enhanced intestinal transport via PEPT1 [10, 12], and these drugs have been used in the clinical setting. The anticancer agents (e.g., gemcitabine [15] and floxuridine [16]) and antiviral drugs (e.g., azidothymidine [10] and levovirin [17]) were also converted to PEPT1 substrates by modifying the L-valine ester (Figure 23.2A). Another strategy for converting PEPT1 substrates is an amino acid peptide modification. For example, midodrine, an antihypotension prodrug for combining glycine via a peptide bond with an active drug, was recently demonstrated to be a substrate for PEPT1 [18] (Figure 23.2B). Thus, conversion of poorly absorbed drugs to PEPT1 substrates should be useful for improving oral bioavailability.

23.3.2. OATP (SLCO)

23.3.2.1. Structure and Tissue Distribution

In 1994, a Na^+ -independent organic anion-transporting polypeptide (Oatp1) was originally cloned from a rat liver cDNA library [19]. Thereafter, many isoforms of Oatp (rodents)/OATP (human) were identified, but unlike other transporters, this family exhibits large interspecies differences [20]. HGNC designated the OATP family as the SLC21 family early on, but since the traditional *SLC21* gene classification does not permit an unequivocal and species-independent identification of genes and gene products, thereafter, all

A) Amino acid ester modification



B) Amino acid peptide modification

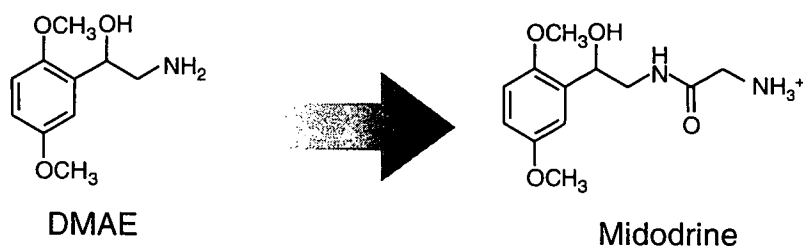


Figure 23.2 Improvement of poorly absorbed drugs using the broad substrate specificity of intestinal PEPT1. (A) Amino acid ester modification of various drugs (e.g., antiviral and anticancer drugs). Among amino acids, L-valine has been suggested to be suitable for this modification. (B) Amino acid peptide modification of the antihypertensive drug midodrine. Among amino acids, glycine has been suggested to be suitable for this modification.

Oatps/OATPs were newly classified within the OATP (protein)/*SLCO* (gene) (human) and Oatp (protein)/*Slco* (gene) (rodents) superfamily according to their phylogenetic relationships and chronology of identification. The methods of classification and the nomenclature were described in detail in a recent review [21].

All members of OATP/Oatp family contain 12 TM domains. Certain transporters show a more restricted tissue expression pattern (i.e., OATP1B1 [old name: OATP-C]/liver), while others such as OATP2B1 (old name: OATP-B) can be detected in almost every tissue that has been investigated [22]. This indicates that some OATPs/Oatps have organ-specific functions, while others might be involved in housekeeping functions.

23.3.2.2. *Function and Pharmacokinetic Roles*

OATP/Oatp families mediate the Na^+ -independent transport of a wide range of amphipathic organic compounds, including bile salts, organic dyes, steroid conjugates, thyroid hormones, anionic oligopeptides, numerous drugs, and other xenobiotic substances [20]. Among the human OATP families, OATP1B1 (old name: OATP-C) has been well characterized. This transporter is exclusively expressed in the liver and located at sinusoidal membranes. Thus, the major pharmacokinetic role of OATP1B1 is hepatic uptake of various clinically important drugs such as pravastatin (3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A [HMG-CoA] reductase inhibitor) [23], enalapril (ACE inhibitor) [24], and valsartan (an angiotensin II receptor antagonist) [25]. Recently, the clinical implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for the *SLCO1B1* gene were reported first by Nishizato et al. [26], in that the 521T>C (Val174Ala) polymorphism in *SLCO1B1* is associated with increased systemic exposures to pravastatin in Japanese subjects. Thereafter, it was also reported that genetic polymorphisms in *SLCO1B1* are a major determinant of interindividual variability in the pharmacokinetics of pravastatin [27–29], the antidiabetic drug repaglinide [30], and atrasentan, a selective endothelin A receptor antagonist [31]. As described above, the OATP/Oatp family exhibits large interspecies differences and this feature may be responsible for the frequency with which SNPs in *SLCO* genes induce functional changes.

OATP2B1 (old name: OATP-B) is expressed at brush-border membranes of intestinal epithelial cells [32]. OATP2B1 exhibited pH-sensitive transport activities for various organic anions such as estrone-3-sulfate, dehydroepiandrosterone sulfate, taurocholic acid, pravastatin, and fexofenadine [33]. However, further studies are needed to determine the specific physiological and pharmacokinetic contribution of OATP2B1 for intestinal absorption of these compounds.

23.3.3. OCT/OCTN/OAT/URAT (SLC22)

23.3.3.1. *Structure and Tissue Distribution*

The organic ion transporter superfamily is composed of various isoforms differing in the mode of transport (uniporters, symporters, and antiporters) and selectivity of substrate charges, although all isoforms have a similar secondary structure of 12 TM domains. In 1994, the first member of the SLC22 family, organic cation transporter 1 (OCT1), was identified from a rat kidney cDNA library by expression cloning [34]. Rat OCT2 was identified in 1996 [35], and the human zwitterion/cation transporter OCTN1 was discovered in 1997 [36]. In the same year, the first organic anion transporter (OAT1) was cloned from rats [37]. In 1998, OCT3 was identified in rats and humans [38, 39], and the human Na^+ -carnitine cotransporter OCTN2 was cloned [40, 41]. Thereafter, various human OAT isoforms (OAT2–OAT4 and urate transporter [URAT1]) were identified [42–45].

In humans, the major expression sites of the SLC22 transporter family are as follows: OCT1/liver (sinusoidal membranes of hepatocytes), OCT2/kidney (basolateral membranes of renal proximal tubules), OCT3/skeletal muscle, placenta, heart, OCTN1/widely distributed, OCTN2/kidney and intestine (brush-border membranes), OAT1/kidney (basolateral membranes of renal proximal tubules), OAT2/liver (sinusoidal membranes of hepatocytes), OAT3/kidney (basolateral membranes of renal proximal tubules), OAT4/kidney (brush-border membranes of renal proximal tubules), and URAT1/kidney (brush-border membranes of renal proximal tubules) [46].

23.3.3.2. *Function and Pharmacokinetic Roles*

The SLC22 family plays important roles for renal secretion of various compounds (e.g., drugs, toxins, and endogenous metabolites via OCTs and OATs) [47–49], the reabsorption of urate (via URAT1) [50], and the intestinal and renal absorption of carnitine (via OCTN2) [51]. OCTs mediate the membrane potential-dependent uptake of organic cations such as tetraethylammonium (TEA, a typical substrate of OCTs), cimetidine (H₂ blocker), and metformin (antidiabetic agent). Previously, it was believed that the substrate recognition of OCT1, OCT2, and OCT3 is not very different, but a recent study revealed that creatinine is a specific substrate for OCT2 [52]. This finding is clinically relevant, because creatinine clearance is widely used to estimate the glomerular filtration rate (GFR). In other words, creatinine clearance may not reflect the true GFR. Moreover, if cationic drugs (OCT2 substrates) are coadministered, creatinine clearance may be decreased by inhibition of OCT2-mediated creatinine secretion, leading to an underestimation of the renal function. Cisplatin (anticancer agent) is a preferred substrate for OCT2 [53, 54], suggesting that the renal toxicity of cisplatin may be triggered by its uptake via OCT2 into renal proximal tubular cells.

OATs can transport various organic anions and the substrate specificity of each isoform has been characterized. P-aminohippurate (PAH) has been widely used as a typical substrate for renal organic anion transport systems. PAH uptake by OAT1 was stimulated by an outwardly directed gradient of α -ketoglutarate, which is consistent with experimental results from studies using renal basolateral membrane vesicles [55]. Antiviral drugs such as adefovir are preferably recognized by OAT1, suggesting that OAT1 may be responsible for the renal toxicity of antiviral agents [56]. Although OAT3 also recognizes PAH, its substrate specificity is different from that of OAT1. For example, estrone sulfate [43], cimetidine [43], and famotidine [57] are preferentially transported by OAT3, but not by OAT1. In addition, OAT3 exhibits a greater activity to transport cephalosporin antibiotics including cefazolin, as compared with OAT1 [58]. This is supported by clinical findings that the mRNA level of OAT3 is significantly correlated with the rate of elimination of cefazolin [59, 60].

OCTN2 is highly expressed in the human intestine from the jejunum to colon [61]. It was recently demonstrated that OCTN2 is predominantly responsible for the uptake of carnitine from the apical surface of mouse small intestinal epithelial cells, suggesting that OCTN2 could be a promising target for the oral delivery of therapeutic agents [62]. Mutations of transporters for the SLC22 family are responsible for specific diseases such as “primary systemic carnitine deficiency” (OCTN2) [63] or “idiopathic renal hypouricemia” (URAT1) [45],

and also thought to be linked with rheumatoid arthritis (OCTN1) [64] and Crohn's disease (OCTN2) [65].

23.3.4. MATE (SLC47)

23.3.4.1. Structure and Tissue Distribution

Organic cations are excreted by the H⁺/organic cation antiporter in the brush-border membranes. As described above, the membrane potential-dependent organic cation transporters located to the basolateral membranes (OCT1–3, SLC22A1–3) have been identified and well characterized [47, 48], but the molecular nature of the H⁺/organic cation antiporter has not been elucidated. Recently, based on *in silico* homology screening, human and mouse orthologs of the multidrug and toxin extrusion (MATE) family, which confers multidrug resistance to bacteria, have been identified [66, 67]. Rat MATE1 [68] and the kidney-specific human MATE2 (MATE2-K) [69] were identified next. This particular drug transporter family recently designated as SLC47 family.

MATE1 and MATE2-K consist of 566–570 amino acid residues with 12 TM domains and show about 50% amino acid identity. Human MATE1 is mostly expressed in luminal membranes of renal proximal tubules and liver canalicular membranes. Mouse MATE1 is also predominantly expressed in the kidney and liver, but it is also expressed in brain glia-like cells and capillaries, pancreatic duct cells, urinary bladder epithelium, and adrenal gland cortex [67]. Rat MATE1 mRNA is highly expressed in the kidney, especially in proximal tubules and placenta, but not in the liver [68]. These findings suggest a clear species difference in the distribution of MATE1 among human, mouse, and rat. Human MATE2-K as well as human MATE1 was located at brush-border membranes of renal proximal tubules [69].

23.3.4.2. Function and Pharmacokinetic Roles

MATE1 can transport not only organic cations such as cimetidine and metformin but also the zwitterionic compound cephalexin [68]. MATE2-K also transports various organic cations, but not cephalexin [69]. The substrate recognition characteristics of MATEs are quite similar, but not identical to those of OCTs. For example, cephalexin is a substrate for MATE1, but not for OCTs, while creatinine is a substrate for OCT2, but not for MATEs. MATE1 exhibits pH-dependent transport properties for cellular uptake and efflux studies using TEA as a substrate, while intracellular acidification by NH₄Cl pretreatment stimulates TEA transport [66–69]. Direct evidence that a proton gradient is the driving force for MATE1 activity was reported recently, utilizing membrane vesicles prepared from cells stably expressing MATE1. TEA transport exhibited the overshoot phenomenon only when there was an outwardly directed H⁺ gradient across the vesicles [70], which has been also observed in rat renal brush-border membrane vesicles [71]. These findings indicate that an oppositely directed H⁺ gradient serves as a driving force for MATE1.

23.3.5. ABC Transporters

23.3.5.1. Structure and Tissue Distribution

P-glycoprotein (P-gp, MDR1) was first isolated from cancer cells where it extrudes chemotherapeutic agents out of the cell thereby conferring multidrug resistance [72]. Subsequent analyses have demonstrated that P-gp is expressed