

200707012B

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17～19年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

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 主任研究者 乾 賢一	_____	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 分担研究者 山岡 義生	_____	2 4
---	-------	-----

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	_____	3 4
---	-------	-----

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	4 9
--------------------	-------	-----

III. 研究成果の刊行物・別刷	_____	5 4
------------------	-------	-----

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 オーダ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。そこで、本研究では、薬物トランスポータの発現プロファイルの作成、プロモーター解析、長年分子実体が不明であった H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE1) の cDNA クローニングとその分子・ゲノム情報の収集、糖尿病治療薬メトホルミンの臨床薬物動態解析と pharmacogenomics 解析を行なった。検討した主な薬物トランスポータは、ペプチドトランスポータ (PEPT)、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)、MATE である。

ヒト消化管（食道～直腸）における種々薬物トランスポータの発現解析によって、PEPT1 は十二指腸＞空腸＞回腸の順に多く発現することがわかった。有機イオントランスポータ群 (OCT1-3、OCTN1-2、OAT1-4、URAT1) では、OCTN2 を除いて、消化管全域においてほとんど発現が認められなかった。カルニチンを生理的基質とする OCTN2 は胃～直腸まで高い発現量を示した。プロモーター解析の結果、PEPT1 を始めとする、7 種類のトランスポータの転写制御機構を初めて明らかにした。例えば、PEPT1 の基礎転写には Sp1 が、臓器特異的な発現には Cdx2 が、絶食による誘導には PPAR α が関与していることを実証した。

腎尿細管上皮細胞の刷子縁膜に局在する、H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE1 及び MATE2-K) の cDNA クローニングに成功し、構造、駆動力、基質特異性等を明らかにした。また MATE1 や MATE2-K は、白金系抗がん剤であるオキサリプラチンを輸送したが、シスプラチンは輸送せず、これら抗がん剤の腎毒性発現に関与していることが示唆された。また、両トランスポータの輸送活性が有意に低下する cSNP を MATE1 遺伝子で 5 種類、MATE2-K 遺伝子で 2 種類同定した。さらに hOCT2/hMATE1 の double transfectants を作製し、本評価系の薬物相互作用や毒性解析における有用性を示した。

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、これらトランスポータ遺伝子多型のメトホルミンの消失半減期に及ぼす影響を調べた (N=16)。その結果これらトランスポータの cSNP や rSNP との有意な関連は認められなかったが、消失半減期の短い患者において、OCT2 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、これまで不明であった種々薬物トランスポータの臨床情報を初めて体系的に整備したものであり、薬物トランスポータの発現に影響を及ぼすゲノム情報の抽出とそれらをオーダーメイド薬物療法へ応用する際の有用な分子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おいては、phenotype と相関する cSNP の報告は極めて少なく、むしろ発現量の個体差が臨床効果の変動因子として重要な役割を果たしていることが、申請者等の臨床研究を中心に明らかになりつつある。しかし薬物トランスポータの発現制御に関わる転写領域の解析は、多くのトランスポータにおいて未着手の状態である。

発現量予測のための因子としては、プロモーター領域の SNP (regulatory SNP: rSNP) あるいはイントロン領域の SNP (intronic SNP: iSNP) が候補として想定される。例えば、抗癌剤イリノテカンの代謝に関わる UGT1A1 の遺伝子多型*28 は、プロモーター領域の遺伝子多型であり、UGT1A1 の転写活性の低下と引き続き発現する UGT1A1 酵素量が減少し、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ているものではない。

本研究は、ゲノム情報を駆使することによって、薬物トランスポータの発現量を予測できる新システムを構築し、その臨床的有用性について明らかにすることを目標としている。この目標を達成するために、薬物トランスポータの発現プロファイルの作成、プロモーター解析、長年分子実体の分からなかった H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE1) の cDNA クローニングとその分子・ゲノム情報の収集、糖尿病治療薬メトホルミンの臨床薬物動態解析と pharmacogenomics 解析を行なった。

B. 研究方法

1) 消化管における薬物トランスポータの発現解析

消化器がん (食道がん、胃がん、大腸がん、膵臓がんなど) と診断され、摘出術を施行された患者から得られた消化管各組織 (食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、回腸、膵臓) の正常部より、total RNA を精製し、リアルタイム PCR 法によって組織中のトランスポータ発現量を定量した。また、各組織から粗膜画分を調製し、ペプチドトランスポータ (PEPT1) の immunoblotting を行った。さらに、胃の病理切片を用いて、抗 CD10 抗体による免疫組織染色を行った。

2) 薬物トランスポータのプロモーター解析

PEPT1、有機アニオントランスポータ (OAT1、OAT3)、有機カチオントランスポータ (OCT2) のプロモーター解析を実施した。各薬物トランスポータの転写開始部位は、5'-RACE 法により決定した。また各薬物トランスポータのプロモーター領域 (転写開始部位の上流約 3-4 kb) は、human genomic DNA を鋳型として PCR により増幅し、pGL3-Basic ベクターにサブクローニングした。プロモーターの deletion construct は制限酵素処理により、また種々シスエレメントに変異を導入した変異体は市販キットを用いて作製した。転写活性は、各 construct を小腸 (Caco-2 細胞) あるいは腎臓 (OK 細胞、LLC-PK₁ 細胞) 由来の細胞に一過性に発現させ、ルシフェラーゼアッセイにより測定した。また転写因子のシスエレメントへの結合実験は、ゲルシフトアッセイ及びクロマチン免疫沈降法により行った。

3) 薬物トランスポータの輸送解析

薬物トランスポータの新たな基質の検索を目的として、種々ヒト型薬物トランスポータ安定発現細胞

を用いて、薬物輸送実験を行った。対象薬物としては、抗がん剤（シスプラチン）、ピグアナイド系糖尿病治療薬（メトホルミン）並びに抗ウイルス薬（アデホビル、シドホビル、テノホビル）を用いた。シスプラチンの定量は Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS)、メトホルミン及び抗ウイルス薬の定量は液体シンチレーションカウンターを用いて行った。

4) MATE1 の cDNA クローニングと発現・機能解析

2005 年に Otsuka らにより報告されたヒト (h) 並びにマウス multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1) のアミノ酸配列を参考にして、ラット (r) MATE1 の cDNA を単離した。Northern blotting やリアルタイム PCR 法により発現臓器や腎内分布を同定した。さらに一過性発現系や安定発現細胞を用いて、MATE1 の輸送機能特性を精査した。また、ヒトの MATE1 及び hMATE2-K の発現ベクターをリポフェクション法によりヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に導入し、rMATE1 と同様に機能解析を行った。トランスフェクション 2 日後に、白金系化合物含有メディアウム中でインキュベーションし、細胞内白金蓄積量を ICP-MS により測定した。

5) 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製し、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製し、必須アミノ酸残基の同定も試みた。

6) 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。

7) 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。摘出組織試料は、本研究のために採取するものではなく、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) ヒト消化管における薬物トランスポータの発現解析

ヒト消化管(食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、腓臓)において、20種類のトランスポータの mRNA 発現量を real-time PCR 法により定量した。PEPT1 は小腸において最も高く発現し、部位別の発現量は十二指腸>空腸>回腸であった(Fig. 1)。一方、食道、結腸、直腸にはほとんど発現していなかったが、胃では有意な発現が認められた。これまで実験動物では PEPT1 が胃に発現している報告はない。そこで PEPT1 の発現の認められた胃の病理切片を用いて HE 染色並びに、上皮細胞の刷子縁膜のマーカーの一つである CD10 の免疫組織染色を

行った。その結果、いずれの組織も腸上皮化生の発生していることが分かり、胃に発現する PEPT1 は腸上皮化生に由来することが示された。一方、PEPT2 はいずれの部位でも発現していなかった。

アミノ酸トランスポータ(刷子縁膜: B⁰AT1、ASCT2、b⁰+AT; 側底膜: LAT1-2、y⁺LAT1、ATA2)の消化管における発現量・発現分布は、各トランスポータにより様々であった。興味深いことに、刷子縁膜において中性アミノ酸の輸送に重要な役割を果たしている B⁰AT1 の小腸における発現分布は、十二指腸<空腸<回腸であり、タンパク質吸収における PEPT1 との協調的役割が示唆された。

MDR1 の小腸における発現分布は、十二指腸<空腸<回腸であった(Fig. 1)。さらに大腸(結腸<直腸)においても、十二指腸や空腸と同程度の発現量を示した。一方、食道、胃、腓臓では発現が認められなかった。

有機イオントランスポータ(OCT1-3、OCTN1-2、OAT1-4、URAT1)群では、OCTN2を除いて、消化管全域においてほとんど発現が認められなかった(Fig. 1)。カルニチンを生理的基質とする OCTN2 は胃~直腸まで高い発現量を示した。

2) 薬物トランスポータのプロモーター解析 (Table 1)

2-1) PEPT1

PEPT1 プロモーター領域の deletion analysis の結果、

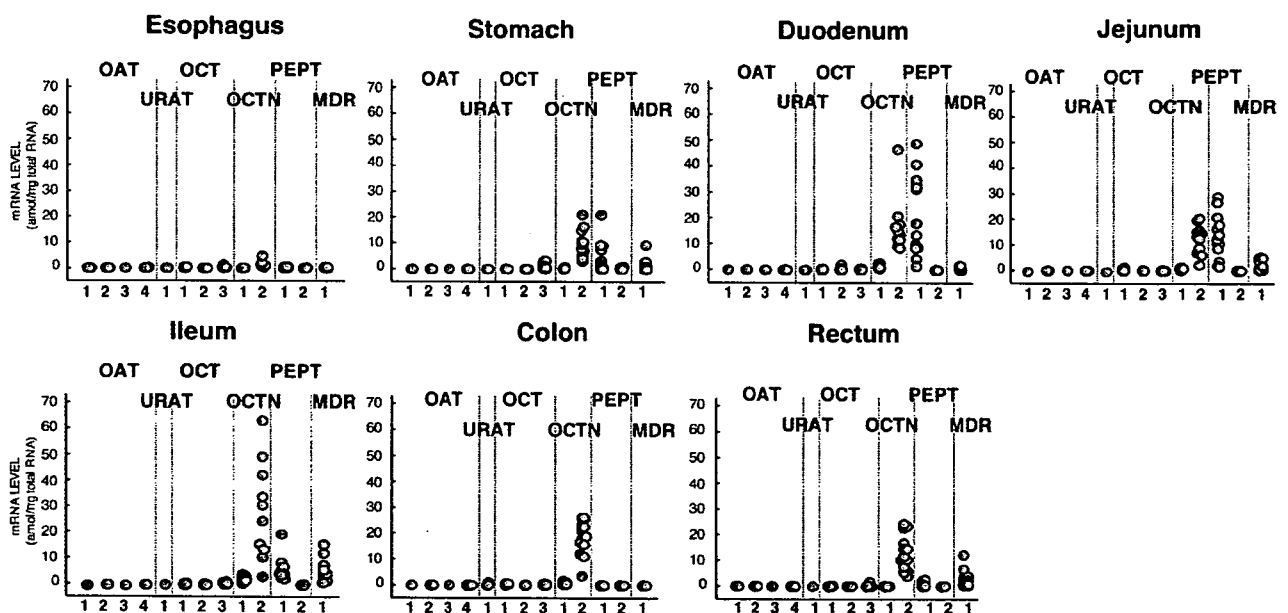


Fig. 1. ヒト消化管における種々薬物トランスポータの発現プロファイル

転写開始部位の上流35から172bp間の領域がPEPT1の転写活性に重要であることが明らかとなった。この領域にはTATA boxは存在せず、基礎転写因子の一つであるSp1が結合すると推定されるGC boxが複数存在した。これら推定Sp1結合サイトにそれぞれ変異を導入することにより転写活性は低下し、また、Caco-2細胞の核抽出液を用いたゲルシフトアッセイにより、推定Sp1結合サイトとSp1の結合が確認された。さらに、PEPT1の転写活性は、Sp1の過剰発現により上昇し、Sp1とDNAとの結合阻害剤であるmithramycin A処理により低下した。これらの結果から、ヒトPEPT1プロモーターのbasal activityにはSp1が複数の結合部位を通して寄与していることが示された。

Sp1の発現分布はユビキタスであり、PEPT1の小腸特異的な発現を説明することはできない。そこで、PEPT1の組織特異性を規定する因子の候補として、腸管特異的な転写因子であり、小腸上皮細胞の分化や機能維持に重要な役割を果たしているCdx2に着目した。Caco-2細胞でCdx2を過剰発現させた場合、PEPT1のプロモーター活性は顕著に上昇したが、プロモーター上におけるCdx2の反応領域は基礎転写に重要であった領域と同一であり、Cdx2の結合配列は存在しなかった。そこで、Cdx2の作用機序について、共発現系、クロマチン免疫沈降法等の検討を加えた結果、Cdx2はSp1と相互作用することによりPEPT1プロモーター領域に作用し、転写を活性化させることが示された。これまで、Cdx2は直接プロモーター領域に結合し転写を制御すると考えられていたが、今回初めてCdx2はプロモーター領域には直接結合せず、Sp1と相互作用することによって転写を制御していることが示され、この制御機構は生化学的にも非常に興味深いと考えられる。また、ヒトの胃組織(腸上皮化生の検体を含む)におけるPEPT1とCdx2のmRNA発現量は良好な相関を示した。これはPEPT1発現調節におけるCdx2の重要性を*in vivo*の面からも支持する結果である。

絶食は小腸PEPT1のmRNA及び蛋白レベルを上昇させ、PEPT1の基質薬物の体内動態にも影響を及ぼすことが明らかとなっている。そこで、絶食時におけるPEPT1発現誘導のメカニズムについて検討を行った。PEPT1の基礎発現や臓器特異的な発現に関与している転写因子Sp1やCdx2は、絶食によっても顕著な上昇は認められず、PEPT1誘導には関与していないと考えられた。肝臓などの組織において、脂肪酸β酸化系酵素の誘導など、絶食に対する適応

反応に重要な役割を果たしている核内受容体PPARαは、小腸にも発現している。そこで、PEPT1誘導におけるPPARαの関与について検討を加えた。48時間絶食させたラットでは、小腸PPARα mRNAの発現レベルが上昇しており、PPARαの内因性リガンドである血中遊離脂肪酸濃度の顕著な上昇を伴っていた。Caco-2細胞をPPARαの合成リガンドであるWY-14643で処理したところ、PEPT1 mRNAレベルが上昇し、PEPT1の輸送活性も増大した。さらに、ラットにWY-14643を経口投与した結果、小腸PEPT1のmRNAレベルが上昇した。最後に、PPARαノックアウトマウスを用いた検討では、絶食による小腸PEPT1の誘導は完全に消失した(Fig. 2)。一方、腎臓では野生型およびノックアウトマウスともに絶食によるPEPT1誘導は観察されなかった。以上の結果から、PPARαが絶食による小腸PEPT1誘導に主要な役割を果たしていることが明らかとなった(Fig. 2)。

2-2) OCT2

5'-RACE法によりヒトOCT2の転写開始部位が翻訳開始部位より385 bp上流に存在することが判明した。ルシフェラーゼアッセイは、有機カチオン輸送系の発現していることが報告されているLLC-PK₁を用いて行った。OCT2プロモーター領域のdeletion analysisの結果、転写開始部位より上流100 bp付近に基礎発現に重要なシスエレメントが存在する可能性が示唆された。この領域には基礎転写に関与するCCAAT boxやE-boxと相同性の高い領域が隣接して存在していた。そこでこれらの領域を含むオリゴDNAを用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、E-boxにのみ転写因子の結合していることがわかった。そこで、E-boxに結合することが知られている転写因子Upstream Stimulatory Factor (USF)1並びにUSF2に対する抗体を用いてスーパーシフトアッセイを行ったところ、USF1がE-boxに結合していることが判明した。さらにUSF1の関与を機能的に確認するため、E-boxに変異を導入しルシフェラーゼ活性を測定したところ、活性は完全に消失した。さらにOCT2のプロモーター活性は、USF1を過剰発現させることによって投与量依存的に促進された。以上のことから、OCT2の基礎転写は、E-boxを介してUSF1によって制御されていることが明らかになった。

Table 1. 本研究課題で解明した種々薬物トランスポータの転写制御機構

Gene	Cis-element	Trans-factor	Feature	Reference
PEPT1	GC Box	Sp1	Basal expression	Am J Physiol, 2005
PEPT1	-	Cdx2	Tissue-specific expression	Biochem Pharmacol, 2006
PEPT1	-	PPAR α	Induction by fasting	Am J Physiol, 2006
PEPT1	DBP-binding site	DBP	Diurnal rhythm	submitted
OCT1 (h)	E-box	USF1/USF2	Basal expression	submitted
OCT1 (h)	DR-2	HNF4 α	Tissue-specific expression	submitted
OCT2 (h)	E-box	USF1	Basal expression	J Pharmacol Exp Ther, 2007
OCT2 (r)	ARE	AR	Induction by testosterone	Pharm Res, 2006
OAT1	IR-8, DR-2	HNF4 α	Basal expression	Am J Physiol, 2007
OAT3	CRE	ATF1	Basal expression	J Pharmacol Exp Ther, 2006
		CREB1	Induction by PKA	J Pharmacol Exp Ther, 2006
MATE1	GC Box	Sp1	Basal expression	Am J Physiol, 2007
MATE2-K	GC Box	Sp1	Basal expression	submitted

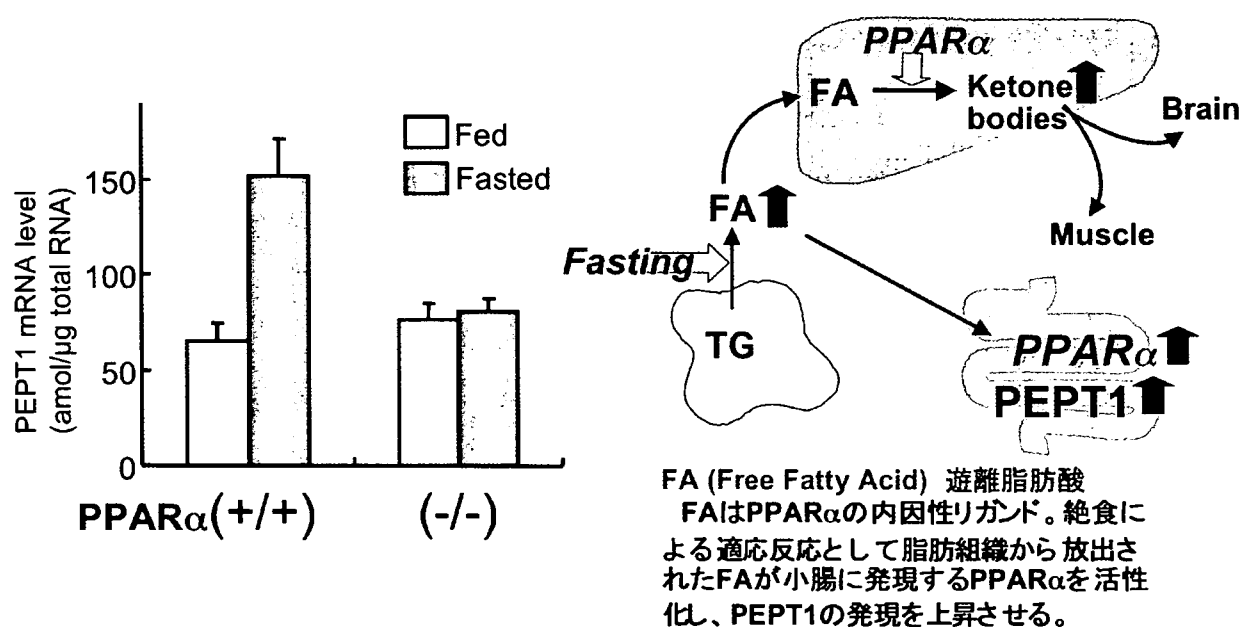


Fig. 2. 絶食による PEPT1 発現誘導のメカニズム

2-3) OAT1

5'-RACE 法並びに NCBI データベースより、ヒト OAT1 の転写開始部位が翻訳開始部位より 308 bp 上流に存在することが判明した。転写開始部位より約 3 kb 上流のプロモーター領域を単離し、レポーターコンストラクトを作製した。まず有機アニオン輸送系の発現している OK 細胞、並びに発現していない HEK293 細胞と Caco-2 細胞を用いて、プロモーター活性を評価したところ、OK 細胞でのみ顕著なプロモーター活性が認められた。次に、OAT1 の転写活性を制御している転写因子の検索を行うため、肝臓、腎臓、小腸などに発現している Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)1 α 、HNF1 β 、HNF4 α に焦点を当て検討を加えた。その結果、HNF4 α のみが OAT1 プロモーター活性を顕著に促進させた。次に、HNF4 α の結合領域を探索するため、各種 deletion constructs を用いて HNF4 α による活性化率を評価したところ、-875~-862 の領域に存在する direct repeat 2 (DR-2) と、-123~-104 の領域に存在する inverted repeat 8 (IR-8) が HNF4 α の結合領域として機能していることが示唆された。DR-2 は典型的な HNF4 α の結合部位として知られているが、IR-8 は最近見いだされた新しいコンセンサス配列である。そこで、これらの領域と HNF4 α との相互作用について検討を加えた。HNF4 α を過剰発現させた OK 細胞から核抽出液を調製し、DR-2 あるいは IR-8 を含むオリゴ DNA を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、いずれにも HNF4 α が結合していることがわかった。DR-2 並びに IR-8 の変異体では、HNF4 α による促進は減少した。従って、OAT1 遺伝子の基礎転写には、IR-8 や DR-2 を介した HNF4 α の制御が重要な役割を果たしていることが判明した。

2-4) OAT3

OAT3 プロモーター領域の deletion analysis の結果、転写開始部位の上流 77 から 214 bp の間の領域が、OAT3 の転写活性に重要であることが明らかとなった。この領域において転写因子の結合部位を検索したところ、完全に保存された cAMP-response element (CRE) の存在することがわかった。CRE に変異を導入することにより転写活性は約 1/3 に減少し、OAT3 の転写調節に CRE の関与していることが示唆された。

CRE には複数の転写因子の結合することが知られていることから、次に OAT3 プロモーター領域の CRE に結合する転写因子の同定を試みた。ゲルシフ

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

3) 薬物トランスポータの輸送解析

3-1) OCT2 を介した抗がん剤シスプラチンの輸送解析

シスプラチンは腎臓に濃縮的に取り込まれ、尿管に強い障害を引き起こすことによって、腎機能を低下させることが知られている。また *in vitro* の検討より刷子縁膜側よりもむしろ側底膜側から強い細胞毒性を示すことから、側底膜に発現するトランスポータの関与が示唆されている。そこで、OCT2 がシスプラチンを輸送することによって、腎特異的な毒性発現を媒介しているのではないかと仮説を立て、検討を行った。

シスプラチンによる細胞毒性に対するトランスポータ発現の影響を調べたところ、ラット OCT2 (rOCT2) 発現により細胞毒性が顕著に増強され、さらに白金の蓄積量の増大が認められた。一方、肝臓に発現するトランスポータ rOCT1 では取り込み上昇は認められなかった。次に、ラット腎臓の rOCT2 発現には雄性ホルモンにより制御を受ける性差が認められるため、この差を利用して *in vivo* における rOCT2 の役割を検討した。シスプラチンの腎臓への組織取り込みクリアランスは雄性ラットにおいて雌性ラットに比べ有意に高いのに対し、肝臓への取り込みクリアランスに差は認められなかった。また、ヒト OCT2 発現細胞においてもシスプラチンによる細胞毒性の顕著な増強が認められた。

3-2) OCT2 を介したメトホルミンの輸送

メトホルミンは 2 型糖尿病患者の治療に用いられ

尿中排泄される。メトホルミンの作用機序の一つとして肝臓における糖新生抑制が想定されているが、糖新生の20-50%は腎臓が担っていること、さらに2型糖尿病患者では、糖新生における腎臓の寄与率が上昇することが報告されている。このような背景のもと、有機カチオントランスポータ OCT1 及び OCT2 に焦点を当て、メトホルミンの輸送実験を行った。その結果、OCT2 は OCT1 に比べて高いメトホルミン輸送活性を示した。また、rOCT2 発現の性差を利用して *in vivo* における rOCT2 の役割を調べたところ、メトホルミンの腎取り込みクリアランスは、雄性ラットが雌性ラットの2倍高値であったことから、メトホルミンの腎移行には OCT2 が主要なトランスポータとして関与していることが示された。

3-3) OAT1 及び OAT3 を介した抗ウイルス薬の輸送

抗ウイルス薬アデホビル、シドホビル、テノホビルの用量規定因子は腎障害であり、これら抗ウイルス薬の尿細管分泌機構が腎障害に関連する。これまで有機アニオントランスポータ OAT1 がアデホビル、シドホビル、テノホビルを基質とすることが報告されているが、他の有機イオントランスポータに関する情報は皆無である。そこで、種々有機イオントランスポータ発現細胞を用いて薬物輸送実験を行った。OAT3 の発現によって、これら抗ウイルス薬の細胞への取り込みは上昇した。また、プロベネシドはその取り込みを有意に阻害した。しかし、OAT3 を介した抗ウイルス薬の輸送活性は、OAT1 に比べ弱かった。また、有機カチオントランスポータ OCT1 及び OCT2 を介した抗ウイルス薬の輸送は認められなかった。以上の結果から OAT1 に加えて、OAT3 もアデホビル、シドホビル、テノホビルを基質とすることが判明した。

4) MATE1 の cDNA クローニングと発現・機能解析
4-1) rMATE1 の構造・臓器分布

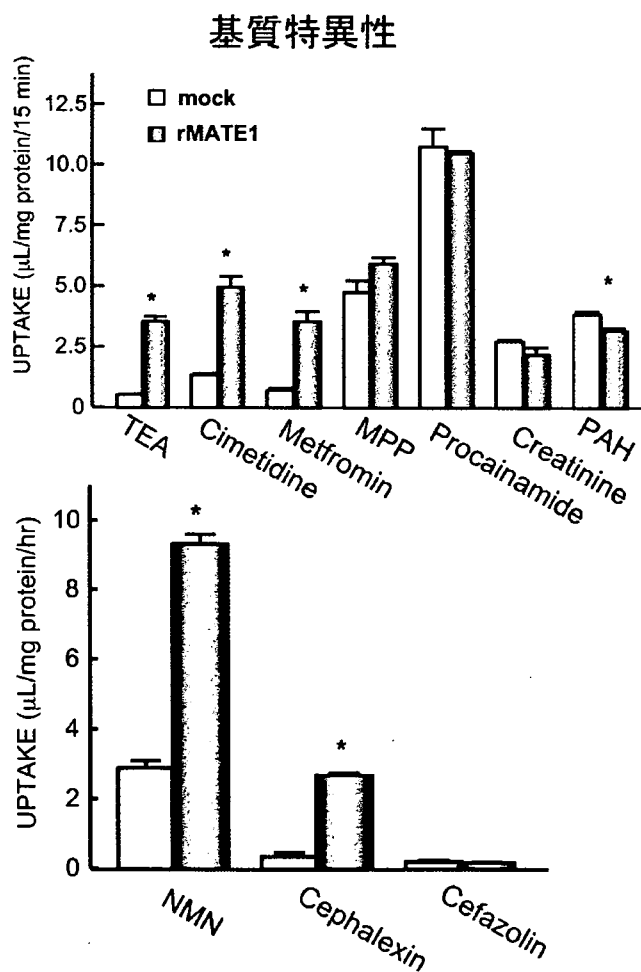
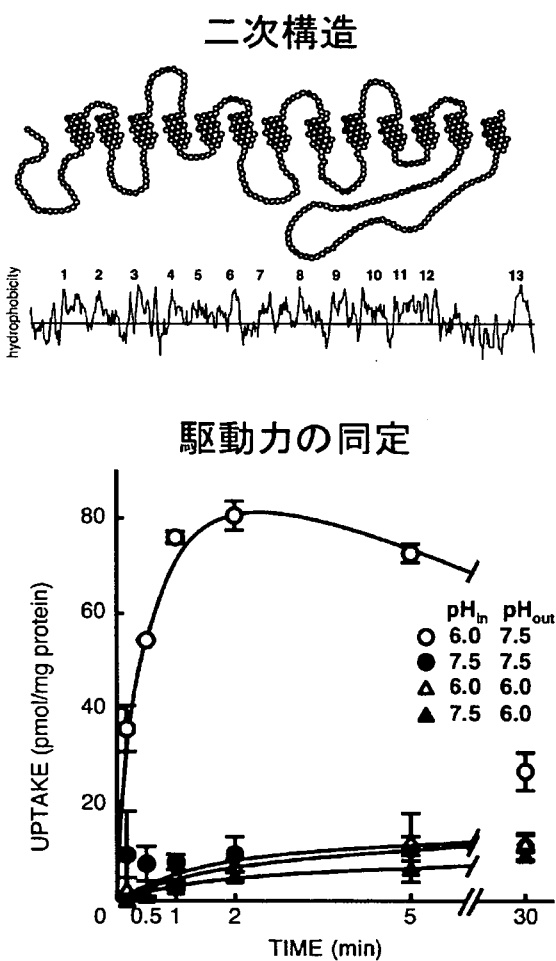


Fig. 3. rMATE1 の構造、駆動力、基質特異性

2005年に、腎尿細管上皮細胞の刷子縁膜に発現する有機カチオントランスポータとして報告されたヒト及びマウス MATE1 の塩基配列を参考にして、rMATE1 cDNA を単離した。rMATE1 は 566 個のアミノ酸から構成され、13 回膜貫通型タンパクであることが推察された (Fig. 3)。rMATE1 mRNA は腎臓に高発現しており、腎内では近位曲尿細管及び直尿細管に限局していた。また腎臓以外の臓器では、胎盤、膵臓、脾臓などに発現していたが、ヒトやマウスで発現の認められた肝臓では発現していなかった。また rMATE1 の C 末端アミノ酸部位に対する抗体を作製し、腎組織切片を用いて免疫組織染色を行ったところ、rMATE1 は近位尿細管上皮細胞の刷子縁膜に局在していることが判明した。

4-2) rMATE1 の機能解析

rMATE1 を HEK293 細胞に一過性に発現させ、種々カチオン性化合物の取り込み実験を行った。H⁺/有機カチオンアンチポータの典型的基質である TEA の取り込みは、基質濃度上昇に伴って飽和性を示し、Km 値は 570 μM と算出された。さらに、rMATE1 はカチオン性化合物であるシメチジン、メトホルミン、N¹-メチルニコチンアミド (NMN) 及び両性イオン型のセファレキシンを輸送した (Fig. 3)。

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

rMATE1 の駆動力として機能していることが推察された。そこで、rMATE1 の駆動力を直接証明するため、rMATE1 安定発現細胞から膜小胞を作製し、取り込み実験を行った。その結果、逆向きの H⁺勾配存在下でのみ、TEA 取り込みの登り坂輸送が認められた (Fig. 3)。さらにその登り坂輸送は、プロトノフォアである FCCP 共存によって消失したことから、rMATE1 は逆向き H⁺勾配を駆動力とするトランスポータであることが判明した。また rMATE1 を介した TEA 取り込みは膜電位の影響を受けなかったことから、H⁺と TEA の化学量論比は 1:1 であることが推察された。

4-3) MATE1 並びに MATE2-K の腎毒性との関係

次に MATE1 及び MATE2-K の機能と腎毒性との関連について、白金系抗がん剤を用いて検討した。高い腎蓄積と強い腎毒性を呈する白金系抗がん剤シスプラチンと、逆に低い腎蓄積性で腎毒性を殆ど示さないオキサリプラチンは共に、側底膜に発現する OCT2 によって輸送された。一方、刷子縁膜側の輸送では、オキサリプラチンは両トランスポータによって顕著に輸送されたが (輸送活性: MATE2-K > MATE1)、シスプラチンはいずれのトランスポータによっても輸送されなかった (Fig. 4)。従って、オキサリプラチンは OCT2 によって腎尿細管に取り込まれるものの、MATEs によって効率的に尿中へ分泌されるため、腎蓄積性・腎毒性を示さないことがわかった (Fig. 4)。一方、シスプラチンでは、MATEs

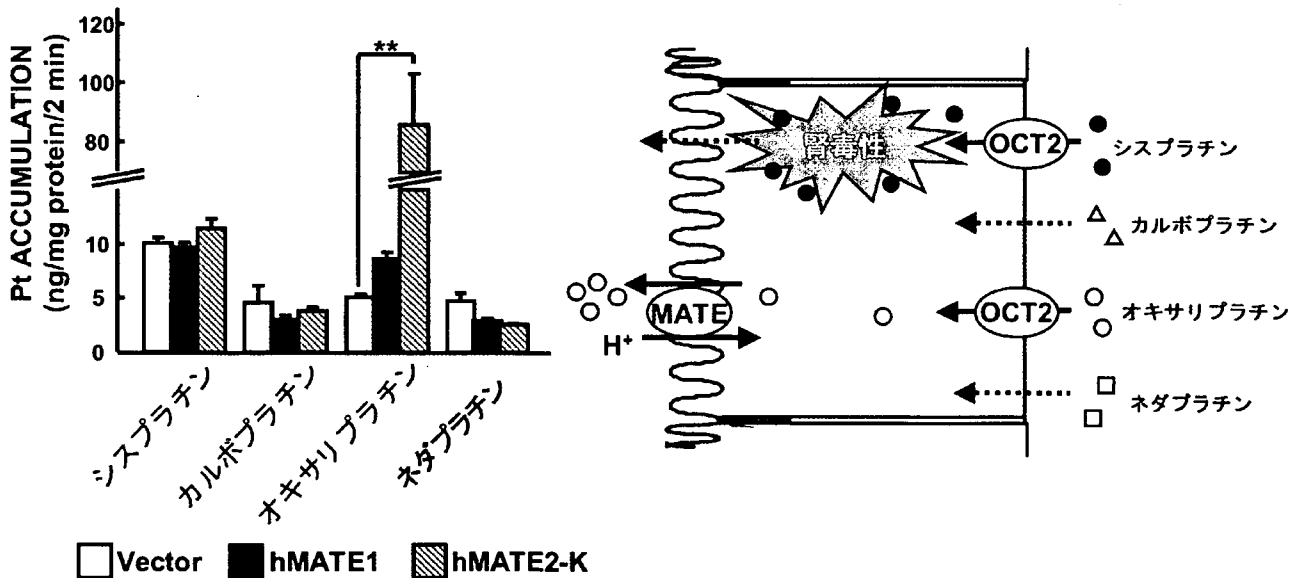


Fig. 4. MATEs による白金系抗がん剤の輸送特性と腎毒性発現

が腎毒性を惹起することが示唆された (Fig. 4)。

5) 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。アミノ酸変異を伴う遺伝子多型では、いずれもホモ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

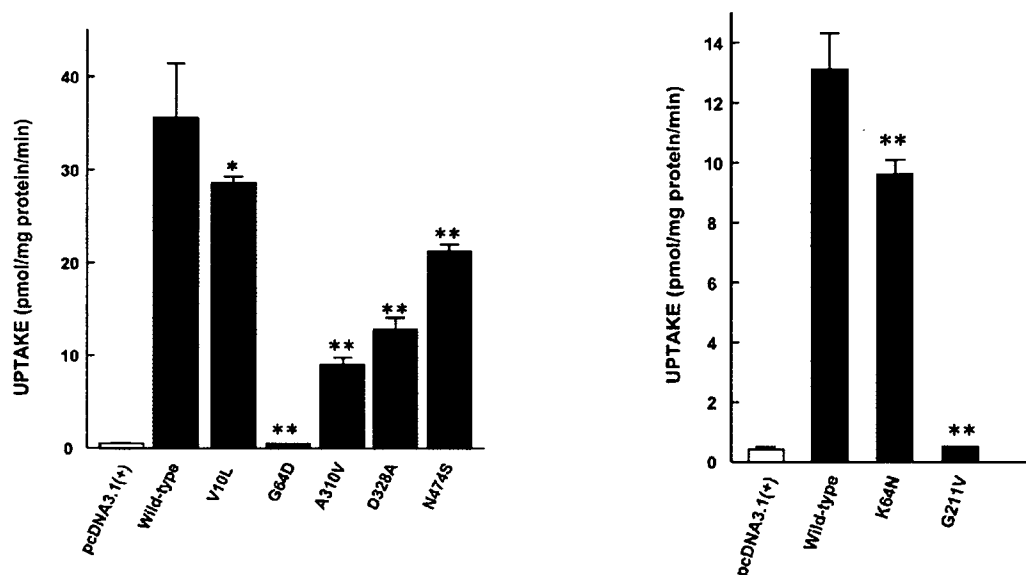


Fig. 5. hMATE1 及び hMATE2-K 変異体による TEA 輸送

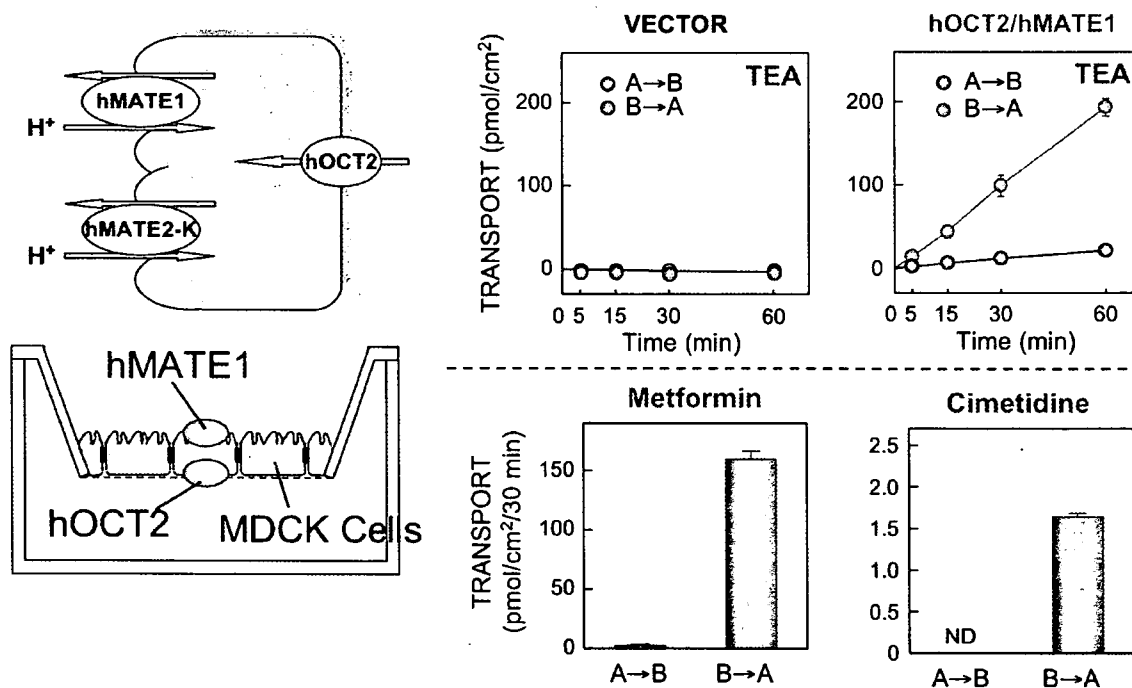


Fig. 6. hOCT2/hMATE1 double transfectant の構築

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。いずれの変異体も細胞膜に発現していたことから、これら変異体の輸送活性の低下は膜へのソーティング異常によるものではないことが示唆された。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。

6) 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. 6)。

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. 6)。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きており、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. 6)。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事が判明した。

7) 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 HbA_{1c} 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ったが、有意な相関は認められなかった。

次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。MATE1 は、rSNP (-32G>A) と 5) 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。

7-1) 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)。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)。しかし、いずれのいずれの遺伝子多型についても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)。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。

7-2) 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。

7-3) 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. 7)。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)を有する患者がヘテロ9名、ホモ1名見いだされたが、各群間で消失半減期の有意な差は認められなかった(Fig. 7)。

D. 考察

経口用β-ラクタム抗生物質、抗ウイルス薬(バラシクロビル、バルガンシクロビルなど)、ACE阻害薬などペプチド類似薬物の腸管吸収において重要な役割を果たしている PEPT1 の消化管分布について検討したところ、十二指腸>空腸>回腸の順に多く発現していることが判明した。さらに胃においても PEPT1 の発現が認められ、それは腸上皮化生に由来することが判明した。プロモーター解析により PEPT1 の小腸特異的な発現には、Cdx2 が関与してい

ることが明らかになったが、ヒトの胃組織(腸上皮化生の検体を含む)における PEPT1 と Cdx2 の mRNA 発現量は良好な相関を示したことから、PEPT1 の発現制御には Cdx2 が重要な役割を果たしていることが in vivo においても実証された。また PEPT1 のプロモーター解析によって、Cdx2 が基礎転写因子である Sp1 と相互作用をすることが明らかになった。両転写因子の相互作用に関する報告は初めてのものであり、この相互作用に関する解析は生化学的および発生学的観点からも興味をもたれる。

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

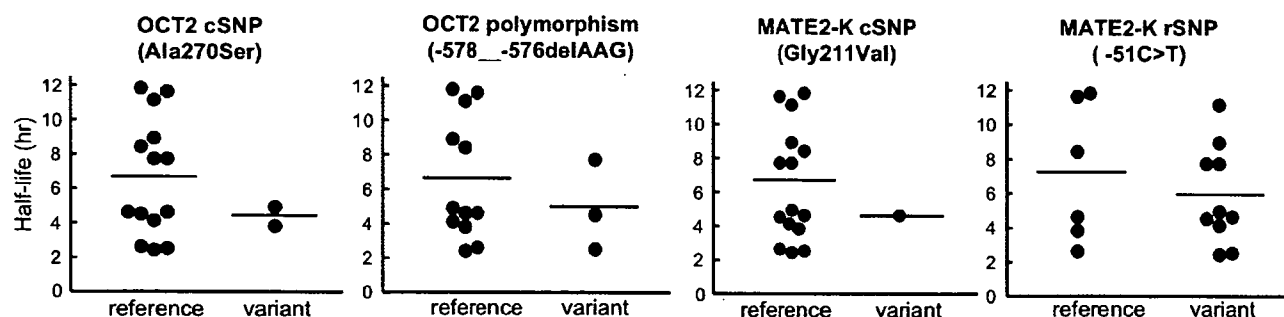


Fig. 7. OCT2 及び MATE2-K の SNP のメトホルミン半減期に及ぼす影響

態への影響、さらには治療効果への影響の有無を検討する必要があると考えられた。

消化管における有機イオントランスポータファミリーの発現分布を調べたところ、OCTN2以外の発現はほとんど認められなかった。すなわち、有機イオン性薬物の体内動態を考える際には、消化管での動態はそれほど考慮に入れる必要がないことが予想される。OCTN2の発現は胃～直腸まで広範囲に広がり発現量も非常に高いこと、またOCTN2は生理的基質であるカルニチンに加えてベラパミルのような薬物も輸送することから、OCTN2が薬物の腸管吸収に何らかの役割を担っていることが推察される。OCTN2の遺伝子変異はカルニチン欠乏症を引き起こすことが知られているが、これらの患者におけるOCTN2基質薬物の体内動態の変動を調べることは興味深い。Oct1⁺マウスを用いた検討より、Oct1はカチオン性薬物の消化管分泌に大きな役割を果たしていることが報告されている。しかし、本研究で明らかになったように、ヒト消化管におけるOCT1の発現はほとんど認められなかった。齧歯類では、OCT1は腎臓に発現しているが、ヒトでは腎臓に発現していないなど、OCT1の発現には種差の認められることから、消化管における発現や役割においても種差の存在することが考えられる。

主任研究者は、平成15~16年度に行った厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）の研究成果として、メサングウム増殖性糸球体腎炎患者では、OAT3 mRNA発現量がアニオン性抗生物質セファゾリン排泄能の良好な予測因子となることや、OAT1 mRNAの発現量が腎不全によって顕著に減少することを報告した。また、内因性カチオンであるNMNの腎排泄にはOCT2発現量が影響していることも見出している。そこで、これらトランスポータの発現制御の基本メカニズムを解明することを目指して、プロモーター解析を行った。OCT2では、-87から-82のプロモーター部位に存在するE-boxに普遍的転写因子の一つであるUSF1が結合し、OCT2の基礎発現を制御していることが判明した。USF1はangiotensinogen、heme oxygenase-1、prolyl-4-hydroxylase (I)など、様々な遺伝子の基礎転写に重要な役割を果たしていることが知られている。E-boxのコンセンサス配列はCANNTGであるが、中央のNNは多くの場合GC若しくはCGとなっている。OCT2プロモーター領域でのE-boxの配列は、CACGTGであり、塩基配列からもこの領域の重要性が支持される。葉酸の代謝に関与するthymidylate

synthase 遺伝子のrSNPとしてE-boxの変異が報告されているが、OCT2のプロモーターにおいては、E-boxのrSNPは見いだされていない。一方、USF1のcSNPが、家族性高脂血症やインスリン感受性に関与していることが報告されており、USF1の機能変化を伴うcSNPが間接的にOCT2の発現量に影響を与えている可能性があり、今後の検討課題と考えられる。

OAT1の基礎転写には、HNF4αが大きく関与していることが判明した。HNF4αは肝臓のみならず、小腸、膵臓、腎臓などにも発現しているが、HNF4αの主要発現臓器である肝臓に比べて、腎臓における役割はほとんど解明されていなかった。OAT1はネフロンセグメントのうち近位尿細管上皮細胞に局限しているが、HNF4αもまた腎臓では近位尿細管にのみ発現していることが報告されており、HNF4αはOAT1の腎内分布を規定する重要な因子であると考えられる。MODY（若年発症成人型糖尿病）1は常染色体優性の遺伝形式を示し、通常25才以下で発症することが知られているが、MODY1の原因遺伝子としてHNF4αの変異が報告されている。MODY1の患者では、OAT1の発現が減少し薬物腎排泄が低下していることが推察されることから、HNF4αの変異のOAT1 mRNA発現に及ぼす影響について検討する必要がある。

OAT3では、-87から-80のプロモーター部位に存在するCREに、CREB-1やATF-1が結合し、OAT3の基礎並びに誘導的な発現に関与していることが判明した。またKikuchiらにより、OAT3の転写制御にはHNF1α/1β（-65から-53のプロモーター部位）が関与していることが報告され、複数の転写因子がOAT3の発現に関与していることが明らかになりつつある。PKAによるCREB-1、ATF-1を介したOAT3遺伝子発現の調節は本研究で初めて明らかになったものであり、*in vivo*においてもOAT3 mRNAがPKAを活性化するホルモンなどによってダイナミックに制御されている可能性が考えられる。これまでの解析の結果、OAT3 mRNA発現量に影響を及ぼすrSNPの同定には至っていないが、PKAを活性化する因子も、OAT3 mRNA予測のためのバイオマーカーになりうる可能性が考えられる。

種々薬物トランスポータの新規基質薬物の検索を行ったところ、抗がん剤シスプラチンやピグアナイド系糖尿病治療薬メトホルミンが、OCT2によって輸送されることを見出した。また抗ウイルス薬であるアデホビル、シドホビル、テノホビルは、OAT1

に加えて、OAT3 にも輸送されることが明らかになった。このように臨床上繁用されており、重篤な副作用を引き起こす薬物の輸送に関わるトランスポータを同定することは、今後の臨床薬物動態解析に有用な情報を提供するものと考えられる。

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によって営まれている。OCT は 1994 年に同定されて以来、輸送機能、発現・局在、cSNP に関する解析が行われ、種々の分子的並びに生化学的特性が明らかにされてきた。本研究事業においても、OCT の転写制御機構や rSNP 解析に取り組み、発現調節機構の分子・遺伝子情報を集積しつつある。一方、H⁺/有機カチオンアンチポータの分子実体は長年不明であり、個別化薬物療法を実践するための基礎情報が欠如していた。我々は、rMATE1 cDNA を新たに単離し、臓器分布、局在、機能特性などを解析することによって、MATE1 が H⁺/有機カチオンアンチポータとして機能していることを実証した。MATE1 は臨床上市用されている、H₂ ブロッカーシメチジン、ビグアナイド系糖尿病治療薬メトホルミン、経口用 β-ラクタム抗生物質セファレキシンを輸送した。

さらに MATE の輸送機能解析より、MATE1 及び MATE2-K の腎保護作用としての役割が提示された。すなわち腎毒性を発現しない白金系抗がん剤オキサリプラチンはシスプラチンと同様に OCT2 によって輸送されるが、MATEs によっても輸送されることが判明した。したがって、MATEs による分泌機構がオキサリプラチンに対する腎保護作用として関与することが推察された。他方、シスプラチンによる腎毒性は、側底膜の OCT2 発現量が規定因子となることが動物実験によって明らかになった。したがって、有機カチオン輸送系が白金系抗がん剤の腎挙動を支配する因子となり、効果・副作用発現に影響することが考えられる。

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 及び MATE2-K が共に発現すること、さらにこれらの基質認識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 hOCT、頂側膜側に hMATE1 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 及び 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 hOCT 及び hMATE1 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ー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

ヒト消化管（食道～直腸）における種々薬物トランスポーターの発現解析によって、PEPT1 は十二指腸>空腸>回腸の順に発現することがわかった。有機イオントランスポーター群(OCT1-3、OCTN1-2、OAT1-4、URAT1)では、OCTN2を除いて、消化管全域においてほとんど発現が認められなかった。カルニチンを生理的基質とする OCTN2 は胃～直腸まで高い発現量を示した。プロモーター解析の結果、PEPT1 を始めとする、7 種類のトランスポーターの転写制御機構を明らかにした。例えば、PEPT1 の基礎転写には Sp1 が、臓器特異的な発現には Cdx2 が、絶食による誘導には PPAR α が関与していることを実証した。

腎尿細管上皮細胞の刷子縁膜に局在する、H⁺/有機カチオンアンチポーター (MATE) の cDNA クローニングに成功し、構造、駆動力、基質特異性等を明らかにした。また両トランスポーターは、白金系抗がん剤であるオキサリプラチンを輸送したが、シスプラチンは輸送せず、これら抗がん剤の腎毒性発現に関与していることが示唆された。また、両トランスポーターの輸送活性が有意に低下する cSNP を MATE1 遺伝子で 5 種類、MATE2-K 遺伝子で 2 種類同定した。

さらに hOCT/hMATE1 の double transfectants を作製し、本評価系の薬物相互作用や毒性解析における有用性を示した。

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ー (OCT2, MATE1, MATE2-K) の影響を調べたところ、これらトランスポーターの 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. 寺田智祐, 乾 賢一: 薬物トランスポーター研究の現状と将来. *臨床化学*, **34**(1) 20-26 (2005)
2. Kimura, N. Okuda, M. and Inui, K.: Metformin transport by renal basolateral organic cation transporter hOCT2. *Pharm. Res.*, **22**(2), 255-259 (2005)
3. Habu, Y., Yano, I., Okuda, M., Fukatsu, A. and Inui, K.: Restored expression and activity of organic ion transporters rOAT1, rOAT3 and rOCT2 after hyperuricemia in the rat kidney. *Biochem. Pharmacol.*, **69**(6), 993-999 (2005)
4. Shimizu, Y., Masuda, S., Nishihara, K., Ji, L., Okuda, M. and Inui, K.: Increased protein level of PEPT1 intestinal H⁺/peptide cotransporter up-regulates absorption of glycylsarcosine and ceftibuten in 5/6 nephrectomized rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **288**(4), G664-G670 (2005)
5. Irie, M., Terada, T., Katsura, T., Matsuoka, S. and Inui, K.: Computational modelling of H⁺-coupled peptide transport via human PEPT1. *J. Physiol.*, **565**(2), 429-439 (2005)
6. Urakami, Y., Kimura, N., Okuda, M., Masuda, S., Katsura, T. and Inui, K.: Transcellular transport of creatinine in renal tubular epithelial cell line LLC-PK₁. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20**(3), 200-205 (2005)
7. Shimakura, J., Terada, T., Katsura, T. and Inui,

- K.: Characterization of the human peptide transporter PEPT1 promoter: Sp1 functions as a basal transcriptional regulator of human PEPT1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **289**(3), G471-G477 (2005)
8. Ueo, H., Motohashi, H., Katsura, T. and Inui, K.: Human organic anion transporter hOAT3 is a potent transporter of cephalosporin antibiotics, in comparison with hOAT1. *Biochem. Pharmacol.*, **70**(7), 1104-1113 (2005)
 9. Kimura, N., Masuda, S., Tanihara, Y., Ueo, H., Okuda, M., Katsura, T., Inui, K.: Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20**(5), 379-386 (2005)
 10. Nishio, N., Katsura, T., Ashida, K., Okuda, M. and Inui, K.: Modulation of P-glycoprotein expression in hyperthyroid rat tissues. *Drug Metab. Dispos.*, **33**(11), 1584-1587 (2005)
 11. Inoue, M., Terada, T., Okuda, M. and Inui, K.: Regulation of human peptide transporter 1 (PEPT1) in gastric cancer cells by anticancer drugs. *Cancer Lett.*, **230**(1), 72-80 (2005)
 12. Terada, T., Shimada, Y., Pan, X., Kishimoto, K., Sakurai, T., Doi, R., Onodera, H., Katsura, T., Imamura, M. and Inui, K.: Expression profiles of various transporters for oligopeptides, amino acids and organic ions along the human digestive tract. *Biochem. Pharmacol.*, **70**(12), 1756-1763 (2005)
 13. Yonezawa, A., Masuda, S., Nishihara, K., Yano, I., Katsura, T. and Inui, K.: Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, **70**(12), 1823-1831 (2005)
 14. Sakurai, Y., Motohashi, H., Ogasawara, K., Terada, T., Masuda, S., Katsura, T., Mori, N., Matsuura, M., Doi, T., Fukatsu, A., and Inui, K.: Pharmacokinetic significance of renal OAT3 (SLC22A8) for anionic drug elimination in patients with mesangial proliferative glomerulonephritis. *Pharm. Res.*, **22**(12), 2016-2022 (2005)
 15. 寺田智祐：ペプチドトランスポーターPEPTs. *創薬動態*, 玉井郁巳、笠井英史、鈴木洋史、千葉雅人、樋坂章博 編, 116-122, 日本薬物動態学会, 2006.
 16. Niida, A., Tomita, K., Mizumoto, M., Tanigaki, H., Terada, T., Oishi, S., Otaka, A., Inui, K. and Fujii, N.: Unequivocal synthesis of (Z)-alkene and (E)-fluoroalkene dipeptide isosteres to probe structural requirements of the peptide transporter PEPT1. *Org. Lett.* **8**(4), 613-616 (2006)
 17. Irie, M., Terada, T., Tsuda, M., Katsura, T. and Inui, K.: Prediction of glycylsarcosine transport in Caco-2 cell lines expressing PEPT1 at different levels. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.*, **452**(1), 64-70 (2006)
 18. Asaka, J., Terada, T., Okuda, M., Katsura, T. and Inui, K.: Androgen receptor is responsible for rat organic cation transporter 2 (rOCT2) gene regulation but not for rOCT1 and rOCT3. *Pharm. Res.*, **23**(4), 697-704 (2006)
 19. Shimakura, J., Terada, T., Shimada, Y., Katsura, T. and Inui, K.: The transcription factor Cdx2 regulates the intestine-specific expression of human peptide transporter 1 through functional interaction with Sp1. *Biochem. Pharmacol.*, **71**(11), 1581-1588 (2006)
 20. Tsuda M., Terada, T., Irie, M., Katsura, T., Niida, A., Tomita, K., Fujii, N. and Inui, K.: Transport characteristics of a novel peptide transporter (PEPT1) substrate, antihypertensive drug midodrine, and its amino acid derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **318**(1), 455-460 (2006)
 21. Noshiro, R., Anzai, N., Sakata, T., Miyazaki, H., Terada, T., Shin, H.J., He, X., Miura, D., Inui, K., Kanai, Y. and Endou, H.: The PDZ domain protein PDZK1 interacts with human peptide transporter PEPT2 and enhances its transport activity. *Kidney Int.*, **70**(2), 275-282 (2006)
 22. Masuda, S., Terada, T., Yonezawa, A., Tanihara, Y., Kishimoto, K., Katsura, T., Ogawa, O. and Inui, K.: Identification and functional characterization of a new human kidney-specific H⁺/organic cation antiporter MATE2-K. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **17**(8), 2127-2135 (2006)
 23. Terada, T., Masuda, S., Asaka, J., Tsuda M., Katsura, T. and Inui, K.: Molecular cloning, functional characterization and tissue distribution of rat H⁺/organic cation antiporter MATE1.

- Pharm. Res.*, **23**(8), 1696-1701 (2006)
24. Ogasawara, K., Terada, T., Asaka, J., Katsura, T. and Inui, K.: Human organic anion transporter 3 gene is regulated constitutively and inducibly via a cAMP-response element. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**(1), 317-322 (2006)
 25. Okuda, M., Kimura, N. and Inui K.: Interactions of fluoroquinolone antibacterials, DX-619 and levofloxacin, with creatinine transport by renal organic cation transporter hOCT2. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**(5), 432-436 (2006)
 26. Shimakura, J., Terada, T., Saito, H., Katsura, T. and Inui, K.: Induction of the intestinal peptide transporter 1 expression during fasting is mediated via peroxisome proliferator-activated receptor α . *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **291**(5), G581-G586 (2006)
 27. Yonezawa, A., Masuda, S., Yokoo, S., Katsura, T. and Inui, K.: Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and MATE family). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**(2), 879-886 (2006)
 28. 上井優一：メトトレキサートとロキソプロフェンの相互作用。薬剤師が変える薬物治療2, 乾 賢一監修、京都大学医学部附属病院薬剤部 編著, 181-185, じほう, 2007.
 29. 本橋秀之：腎薬物トランスポータの発現変動と薬物腎排泄における役割。薬剤師が変える薬物治療2, 乾 賢一監修、京都大学医学部附属病院薬剤部 編著, 186-193, じほう, 2007.
 30. 寺田智祐：ペプチドトランスポータを介した薬物吸収の改善。薬剤師が変える薬物治療2, 乾 賢一監修、京都大学医学部附属病院薬剤部 編著, 194-199, じほう, 2007.
 31. 増田智先、米澤 淳：シスプラチンによる腎障害発症メカニズムの解明に向けて。薬剤師が変える薬物治療2, 乾 賢一監修、京都大学医学部附属病院薬剤部 編著, 200-210, じほう, 2007.
 32. Terada, T. and Inui, K.: Gene expression and regulation of drug transporters in the intestine and kidney. *Biochem. Pharmacol.*, **73**(3), 440-449 (2007)
 33. 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)
 34. 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)
 35. 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)
 36. 米澤 淳、乾 賢一： H^+ /organic cation antiporter (MATE/SLC47A)。腎と透析、63(4), 466-469, 2007
 37. 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)
 38. 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)
 39. 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)
 40. 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)
 41. Ogasawara, K., Terada, T., Asaka, J., Katsura, T. and Inui, K.: Hepatocyte nuclear factor- 4α regulates the human organic anion transporter 1 gene in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **292**(6), F1819-F1826 (2007)
 42. 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)
43. 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)
44. 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)
45. 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)
46. 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)
47. 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)
48. 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)
49. 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)
50. 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)
51. 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)
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. Terada, T. and Inui, K.: Physiological and pharmacokinetic roles of H⁺/organic cation antiporters (MATE/SLC47A). *Biochem. Pharmacol.*, in press.
56. 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. 乾 賢一：薬物トランスポータのTDM研究 (特別講演). 第22回日本TDM学会・学術大会 (2005年5月、沖縄県宜野湾市)
2. Inui, K.: Clinical implication of drug transporters. (Symposium) BioMedical Transporters 2005 (August 2005, Switzerland)
3. Yonezawa, A., Masuda, S., Nishihara, K., Katsura,