

- T. and Inui, K.: Role of rOCT2 in cisplatin-induced nephrotoxicity. *BioMedical Transporters 2005* (August 2005, Switzerland)
4. 寺田智祐、朝賀純一、桂 敏也、乾 賢一：ラット有機カチオントランスポータの転写制御機構。第 11 回分子腎臓研究会 (2005 年 9 月、京都市)
 5. 朝賀純一、寺田智祐、桂 敏也、奥田真弘、乾 賢一：ラット有機カチオントランスポータ rOCT1-3 の転写活性に及ぼすテストステロンの影響。第 1 回創剤フォーラム若手発表討論会 (2005 年 9 月、東京都)
 6. Inui, K.: Expression and gene regulation of drug transporters (SLC) -transcriptional mechanisms for PEPT1-. (Symposium) 13thISSX/20thJSSX (October 2005, Hawaii)
 7. Tsuda, M., Terada, T., Katsura, T. and Inui, K.: Midodrine, an antihypotension drug, is transported by human H⁺/peptide cotransporter (PEPT1). 13thISSX/20thJSSX (October 2005, Hawaii)
 8. Terada, T., Shimada, Y., Pan, X., Doi, R., Onodera, H., Katsura, T. and Inui, K.: Expression profiles of H⁺/peptide cotransporter (PEPT1) along the human digestive tract. 13thISSX/20thJSSX (October 2005, Hawaii)
 9. Shimakura, J., Terada, T., Katsura, T. and Inui, K.: Characterization of the human H⁺/peptide cotransporter (PEPT1) promoter: critical role of Sp1 for the basal transcriptional regulation of PEPT1. 13thISSX/20thJSSX (October 2005, Hawaii)
 10. 本橋秀之：腎薬物トランスポータ：発現変動ならびに腎疾患患者における薬物動態学的重要性。(シンポジウム) 第 27 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2005 年 11 月、京都市)
 11. 米澤 淳、増田智先、西原久美子、矢野育子、桂 敏也、乾 賢一：シスプラチン誘発腎毒性の規定因子としての有機カチオントランスポータ OCT2 (slc22a2)。第 27 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2005 年 11 月、京都市)
 12. 谷原悠子、木村尚子、増田智先、桂 敏也、乾 賢一：腎有機カチオントランスポータ OCT2 の基質認識特性。第 27 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2005 年 11 月、京都市)
 13. 島倉 仁、寺田智祐、桂 敏也、乾 賢一：ヒトペプチドトランスポータ (PEPT1, SLC15A1) の組織特異的発現を規定する転写調節機構。第 27 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2005 年 11 月、京都市)
 14. 寺田智祐、乾 賢一：ペプチドトランスポータの基礎と臨床。(シンポジウム) 第 26 回日本臨床薬理学会年会 (2005 年 12 月、大分県別府市)
 15. Inui, K.: Physiological and clinical implication of drug transporters in the intestine. (Symposium) Joint International Symposium on Integrated Medicinal Science for Drug Discovery - Tradition to Structural Biology /Medicinal Science Research on Difficult Diseases (March 2006, Kyoto)
 16. 朝賀純一、寺田智祐、桂 敏也、乾 賢一：ヒト有機カチオントランスポータ (hOCT2) の発現調節機構。日本薬剤学会第 21 年会 (2006 年 3 月、金沢市)
 17. 西原久美子、増田智先、米澤 淳、桂 敏也、乾 賢一：腎不全状態が及ぼす小腸の機能変動に関連する因子の探索。日本薬学会第 126 年会 (2006 年 3 月、仙台市)
 18. 小笠原健、寺田智祐、本橋秀之、桂 敏也、乾 賢一：ヒト有機アニオントランスポータ OAT3 の転写制御機構。日本薬学会第 126 年会 (2006 年 3 月、仙台市)
 19. 岸本幸四朗、本橋秀之、上尾治正、桂 敏也、深津敦司、乾 賢一：腎疾患時におけるヒト有機カチオントランスポータ hOCT 発現変動の N-methylnicotinamide 腎クリアランスに及ぼす影響。日本薬学会第 126 年会 (2006 年 3 月、仙台市)
 20. 津田真弘、入江めぐみ、寺田智祐、桂 敏也、乾 賢一：H⁺駆動型ペプチドトランスポータ (PEPT1) 発現量の異なるヒト培養腸上皮細胞 Caco-2 における glycy sarcosine 輸送の予測。日本薬学会第 126 年会 (2006 年 3 月、仙台市)
 21. 島倉 仁、寺田智祐、桂 敏也、乾 賢一：絶食時の小腸 PEPT1 発現亢進における PPAR α の関与。日本薬学会第 126 年会 (2006 年 3 月、仙台市)
 22. Asaka, J., Terada, T., Katsura, T. and Inui, K.: Functional characterization and tissue distribution

- of rat H⁺/organic cation antiporter MATE1. 1st Asia Pacific ISSX Meeting (May 2006, Jeju Island, Korea)
23. Motohashi, H., Kishimoto, K., Katsura, T., Fukatsu, A. and Inui, K.: Expression levels of hOCT2 and renal excretion of N¹-methylnicotineamide in patients with renal disease. 1st Asia Pacific ISSX Meeting (May 2006, Jeju Island, Korea)
 24. 寺田智祐、津田真弘、桂 敏也、乾 賢一：低血圧症治療薬ミドドリンの消化管吸収におけるペプチドトランスポータ PEPT1 の役割。日本膜学会第 28 年会 (2006 年 6 月、札幌市)
 25. 米澤 淳、増田智先、横尾幸子、西原久美子、桂 敏也、乾 賢一：白金系抗癌剤による尿細管選択的な毒性発現。第 49 回日本腎臓学会学術総会 (2006 年 6 月、東京都)
 26. 小笠原健、寺田智祐、本橋秀之、桂 敏也、乾 賢一：ヒト有機アニオントランスポータ OAT3 の発現制御機構と rSNP 解析。第 49 回日本腎臓学会学術総会 (2006 年 6 月、東京都)
 27. 寺田智祐、増田智先、朝賀純一、津田真弘、桂 敏也、乾 賢一：ラット H⁺/有機カチオン逆輸送体 (rMATE1) の遺伝子クローニングと機能解析。第 49 回日本腎臓学会学術総会 (2006 年 6 月、東京都)
 28. Masuda, S., Terada, T., Yonezawa, A., Tanihara, Y., Katsura, T. and Inui, K.: A new human kidney H⁺/organic cation antiporter MATE2-K: cDNA cloning, tissue distribution and functional characterization. 第 12 回分子腎臓研究会 (2006 年 9 月、東京都)
 29. 乾 賢一：小腸および腎薬物トランスポータの構造・機能と臨床的意義。長井長義記念シンポジウム (2006 年 9 月、徳島市)
 30. 米澤 淳、横尾幸子、増田智先、桂 敏也、乾 賢一：白金系抗癌剤による腎毒性発現機構：有機カチオントランスポータの関与と基質認識特性。第 16 回日本医療薬学会年会 (2006 年 9 月、金沢市)
 31. 谷原悠子、増田智先、木村尚子、大澤理代、桂 敏也、藤本新平、稲垣暢也、乾 賢一：経口血糖降下薬メトホルミンの体内動態解析。第 16 回日本医療薬学会年会 (2006 年 9 月、金沢市)
 32. 本橋秀之：腎疾患時における薬物トランスポートの変動。(シンポジウム) 第 2 回創剤フォーラム若手研究発表討論会 (2006 年 10 月、京都市)
 33. Asaka, J., Terada, T., Katsura, T. and Inui, K.: Functional promoter analyses of human organic cation transporter 2 (OCT2/SLC22A2). 2006 AAPS Annual Meeting and Exposition (October 2006, San Antonio, USA)
 34. Terada, T., Masuda, S., Asaka, J., Tsuda, M., Katsura, T. and Inui, K.: Molecular cloning and functional characterization of rat H⁺/organic cation antiporter (MATE1). 2006 AAPS Annual Meeting and Exposition (October 2006, San Antonio, USA)
 35. Masuda, S., Terada, T., Yonezawa, A., Tanihara, Y., Katsura, T. and Inui, K.: cDNA cloning and functional characterization of a novel H⁺/organic cation antiporter MATE2-K specifically expressed in the kidney. 2006 AAPS Annual Meeting and Exposition (October 2006, San Antonio, USA)
 36. Yonezawa, A., Nishihara, K., Yokoo, S., Masuda, S., Katsura, T. and Inui, K.: OCT2/SLC22A2 mediates renal accumulation of cisplatin, which causes nephrotoxicity. 2006 AAPS Annual Meeting and Exposition (October 2006, San Antonio, USA)
 37. 増田智先、寺田智祐、米澤 淳、谷原悠子、桂 敏也、乾 賢一：ヒト腎のみに発現する新規 H⁺/有機カチオンアンチポータ MATE2-K の cDNA クローニング、組織分布並びに機能解析。第 28 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2006 年 11 月、静岡市)
 38. Masuda, S., Terada, T., Yonezawa, A., Tanihara, Y., Katsura, T. and Inui, K.: A novel human kidney-specific H⁺/organic cation antiporter MATE2-K: cDNA cloning, tissue distribution and functional characterization. Renal Week 2006 (November 2006, San Diego, USA)
 39. Yonezawa, A., Yokoo, S., Masuda, S., Katsura, T. and Inui, K.: Role of human organic cation transporters (hOCT and hMATE) in the cellular accumulation and toxicity of cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin. Renal Week 2006 (November 2006, San Diego, USA)
 40. 津田真弘、寺田智祐、朝賀純一、増田智先、

- 桂 敏也、乾 賢一：ラット H⁺/有機カチオン逆輸送体 (rMATE1) の機能解析、組織分布、並びに局在。第 21 回日本薬物動態学会年会 (2006 年 11 月、東京都)
41. 辻 淑恵、上井優一、本橋秀之、桂 敏也、乾 賢一：有機アニオントランスポータ hOAT1 及び hOAT3 によるミコフェノール酸及びそのグルクロン酸抱合体の輸送に関する研究。第 21 回日本薬物動態学会年会 (2006 年 11 月、東京都)
42. 上尾治正、本橋秀之、桂 敏也、乾 賢一：クロライドイオン依存的なヒト有機アニオントランスポータの活性上昇：OAT1 及び OAT3 に対する影響の差異。第 21 回日本薬物動態学会年会 (2006 年 11 月、東京都)
43. 西尾直樹、桂 敏也、乾 賢一：甲状腺ホルモンレセプターによる MDR1 遺伝子の発現調節機構。第 21 回日本薬物動態学会年会 (2006 年 11 月、東京都)
44. 横尾幸子、米澤 淳、増田智先、桂 敏也、乾 賢一：4 種の白金系抗癌剤の腎蓄積量とそれに起因する腎障害発症の相違。第 21 回日本薬物動態学会年会 (2006 年 11 月、東京都)
45. 西原久美子、紀 琳、増田智先、桂 敏也、乾 賢一：5/6 腎摘出雌性ラットにおける尿細管トランスポータの機能的・分子の変動。第 21 回日本薬物動態学会年会 (2006 年 11 月、東京都)
46. Tsuda, M., Terada, T., Irie, M., Katsura, T. and Inui, K.: Computational simulation of Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3). 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 3 回国際シンポジウム (2006 年 12 月、京都市)
47. 寺田智祐、乾 賢一：薬物輸送と SLC トランスポーター。(シンポジウム) 第 1 回トランスポーター研究会 (2006 年 12 月、東京都)
48. 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ー OAT3 遺伝子における CREB-1、ATF-1 の役割。第 1 回トランスポーター研究会 (2006 年 12 月、東京都)
49. 津田真弘、寺田智祐、朝賀純一、上羽美貴、桂 敏也、乾 賢一：膜小胞系を用いた H⁺/有機カチオンアンチポータ MATE1 の駆動力の同定。第 1 回トランスポーター研究会 (2006 年 12 月、東京都)
50. Terada, T. and Inui, K.: Pharmacokinetic and pathophysiological roles of intestinal H⁺/peptide cotransporter (PEPT1). 7th Colloquium for the Study of Gastrointestinal Defense System (January 2007, Osaka)
51. 本橋秀之、桂 敏也、乾 賢一：腎有機カチオントランスポータの変動と N^l-メチルニコチンアミド腎排泄との相関。特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」第一回若手ワークショップ (2007 年 1 月、静岡市)
52. Asaka, J., Terada, T., Tsuda, M., Katsura, T. and Inui, K.: Identification of essential cysteine and histidine residues of H⁺/organic antiporters, MATEs. AAPS workshop on drug transporters in ADME: From bench to the bedside (March 2007, North Bethesda, USA)
53. 寺田智祐：ペプチドトランスポータの機能と発現制御に関する研究。(平成 19 年度日本薬学会奨励賞受賞講演) 日本薬学会第 126 年会 (2007 年 3 月、富山市)
54. 寺田智祐、乾 賢一：小腸および腎薬物トランスポータの転写制御機構。(シンポジウム) 日本薬学会第 127 年会 (2007 年 3 月、富山市)
55. 朝賀純一、寺田智祐、津田真弘、桂 敏也、乾 賢一：H⁺/有機カチオンアンチポータ MATE の必須 cysteine 残基の同定。日本薬学会第 127 年会 (2007 年 3 月、富山市)
56. 上尾治正、本橋秀之、桂 敏也、乾 賢一：Cl⁻依存的なヒト有機アニオントランスポータの活性上昇：hOAT1 及び hOAT3 に対する影響の違い。日本薬学会第 127 年会 (2007 年 3 月、富山市)
57. 谷原悠子、増田智先、佐藤朋子、寺田智祐、桂 敏也、乾 賢一：ヒト H⁺/有機カチオンアンチポータ hMATE1 及び hMATE2-K の構造・機能の比較解析。日本薬学会第 127 年会 (2007 年 3 月、富山市)
58. Inui, K.: Pharmacogenomics of MDR1/ABCB1 and CYP3As in tacrolimus therapy after organ transplantation. PSWC2007 (April 2007, Amsterdam, The Netherlands)
59. Katsura, T., Nishio, N. and Inui, K.: Transcriptional activation of MDR1 gene by thyroid hormone receptor. PSWC2007 (April 2007, Amsterdam, The Netherlands)

60. 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)
61. 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)
62. 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)
63. 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）
64. 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）
65. 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）
66. 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)
67. 谷原悠子、増田智先、佐藤朋子、米澤 敦、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）
68. 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)
69. 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)
70. 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）
71. Inui, K.: Molecular characterization of H⁺/organic cation antiporters (MATEs). BioMedical Transporters 2007 (July 2007, Bern, Switzerland)
72. 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)
73. 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)
74. 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）
75. 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）
76. Inui, K.: Personalized tacrolimus therapy in patients after liver transplantation. 8th International ISSX Meeting (October 2007, Sendai)
77. 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)
78. 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)
79. Inui, K.: Pharmacogenomic on tacrolimus therapy in liver transplant patients. Joint Cold Spring Harbor Laboratory/Wellcome Trust Conference

- (October 2007, Hinxton, UK) 特になし
80. 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) 2. 実用新案登録
特になし
81. 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) 3. その他
特になし
82. 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)
83. 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)
84. 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)
85. Inui, K.: Pharmacogenomics of immunosuppressants. PGRN-RIKEN-JSSX Joint Workshop on Pharmacogenomics in Drug Development (February 2008, Tokyo)
86. 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)
87. Inui, K.: Pharmacogenomics of SLC22A/OCT,OAT and SLC47A/MATE drug transporters. 2008 International Conference on Pharmacogenomics (April 2008, Busan, Republic of Korea)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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) が発現しているが、これらトランスポータの発現制御に関するゲノム・分子情報は乏しい。そこで本研究では、1) 種々薬物トランスポータの発現量解析、2) OCT1 のプロモーター解析、3) rSNP 解析、4) 発現量に影響を及ぼす因子の探索、について検討を加えた。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。肝臓で高発現している OCT1 のプロモーター解析を行い、USF1/USF2 が E-box を介して OCT1 の基礎転写を規定していることが判明した。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 もまた、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。これまで、*in vitro* 発現系や動物実験を用いた解析より、これらトランスポータの輸送

特性や薬物動態学的役割が明らかになりつつあるが、ヒト肝臓における発現プロファイル、発現制御機構、並びに発現量の個体差に関連する SNP の情報は乏しい。また、肝薬物トランスポータの発現量に影響を及ぼす rSNP 以外の因子として、肝炎ウイルス感染の有無、肝硬変の影響などについても体系的な解析は行なわれていない。そこで本研究では、これら肝薬物トランスポータの発現制御に関する分子・ゲノム情報を収集し、個別化薬物療法を実施するための基盤整備を試みた。

B. 研究方法

1) 肝薬物トランスポータの発現量解析

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発現量を定量した (N=109)。測定した薬物トランスポータは SLC トランスポータ (10 種類) 並びに ABC トランスポータ (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) OCT1 のプロモーター解析

OCT1 の転写開始部位は、5'-RACE 法により決定した。また OCT1 のプロモーター領域 (転写開始部位の上流約 2.5 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、ヒト肝がん由来の細胞 (Huh-7 及び HepG2) を用いて、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により行った。

3) 肝薬物トランスポータの rSNP 解析

1) で抽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。

4) 薬物トランスポータ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の発現量の関連についても調べた。

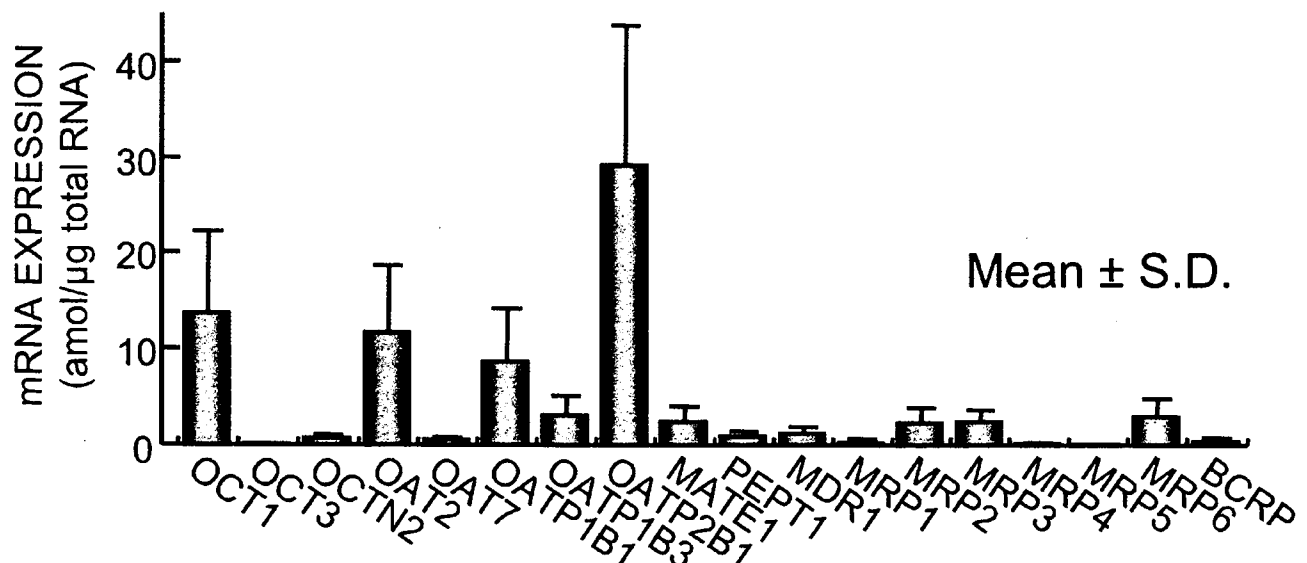


Fig. 1. 肝薬物トランスポータ mRNA の発現プロファイル

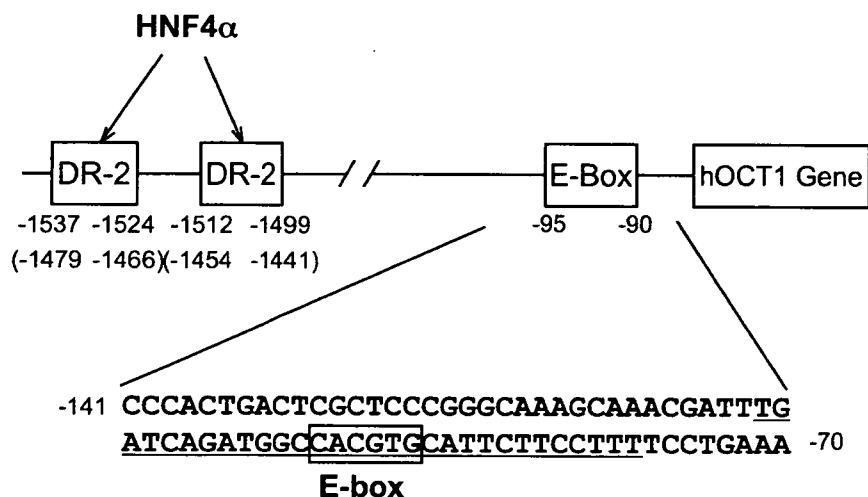


Fig. 2. OCT1 のプロモーター領域の塩基配列

(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ー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)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。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ー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ー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トランスポーターファミリーでは、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トランスポーターファミリーでは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) OCT1のプロモーター解析

SLCトランスポーターファミリーの中で、肝臓で発現量の多かったOCT1のプロモーター解析を行った。5'-RACE法によりヒトOCT1の転写開始部位が翻訳開始部位より105bp上流に存在することが判明した。転写開始部位より上流約2.5kbのプロモーター領域を含むレポーターコンストラクトを作製し、培養肝細胞Huh-7並びにHepG2を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、転写開始部位より上流-140~70bp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(Fig.2)。この領域にはUSF1/USF2などの転写因子が結合し、基礎転

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)

| Transpoter | 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 | C/C | 0 |
| | | | A | 11.5 | G/G | 85 |
| | *-616 | - | G | 95.0 | G/A | 23 |
| | | | A | 5.0 | A/A | 1 |
| | -317 | rs11835045 | T | 95.0 | G/G | 98 |
| | | | C | 5.0 | G/A | 11 |
| | *-92 | - | T | 99.1 | A/A | 0 |
| | | | C | 0.9 | T/T | 98 |
| OATP1B3 | -503 | rs1515766 | T | 99.1 | T/C | 11 |
| | | | C | 0.9 | C/C | 0 |
| OATP2B1 | *-916 | - | A | 99.5 | T/T | 107 |
| | | | G | 0.5 | T/C | 2 |
| | -835 | rs2851067 | G | 23.4 | C/C | 0 |
| | | | T | 76.6 | G/G | 12 |
| | -747 | rs4100076 | A | 68.3 | G/T | 27 |
| | | | C | 31.7 | T/T | 70 |
| | -730 | rs2851068 | T | 23.4 | A/A | 51 |
| | | | C | 76.6 | A/C | 47 |
| | -618 | rs12361540 | G | 73.4 | C/C | 11 |
| | | | A | 26.6 | T/T | 10 |
| | -282 | rs2712807 | A | 54.1 | T/C | 31 |
| | | | G | 45.9 | C/C | 68 |
| | *-89 | - | G | 99.5 | G/G | 61 |
| | | | A | 0.5 | G/A | 38 |
| MATE1 | *-65 | - | C | 99.5 | A/A | 10 |
| | | | A | 0.5 | A/A | 34 |
| | *-32 | - | G | 99.5 | A/G | 50 |
| | | | A | 0.5 | G/G | 25 |
| MRP2 | -24 | rs717620 | C | 79.4 | G/G | 108 |
| | | | T | 20.6 | G/A | 1 |
| | | | | | 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 | | |

写に関与することが報告されている E-box の塩基配列が完全に保存されていた。そこで、USF1/USF2 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、プロモ-

ター活性は完全に消失した。さらに OCT1 のプロモター活性は、USF1 あるいは USF2 を過剰発現させることによって用量依存的に促進された。また、E-box を含むオリゴヌクレオチドと Huh-7 の核抽出

液を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、特異的なバンドが検出され、そのバンドは USF1 あるいは USF2 の抗体の添加によってスーパーシフトした。また OCT1 の転写を制御することが報告されている HNF4 α と USF1/2 を共存させると、OCT1 のプロモーター活性はさらに促進された。以上のことから、OCT1 の基礎転写には、E-box を介した USF1/USF2 による制御が関与していることが明らかになった。

3) 肝薬物トランスポータの rSNP 解析

肝臓において発現の多かった 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。

3-1) 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。

3-2) 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。

3-3) 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%)、-814 G>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。

3-4) 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。

3-5) 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%)、-747 A>C (アレル頻度 32%)、-730 T>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. 3)。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. 3)。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。

3-6) 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。

3-7) 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. 3)。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。

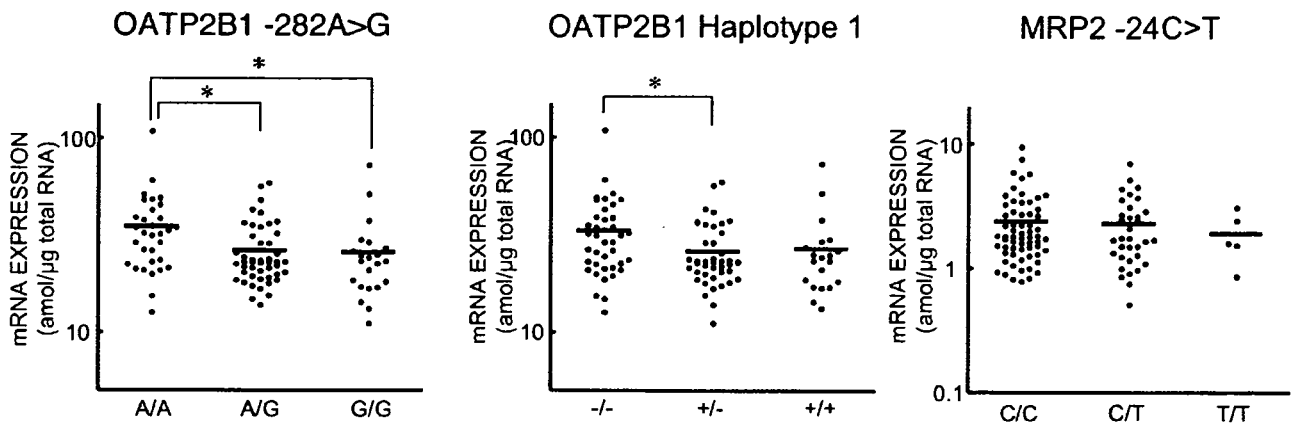
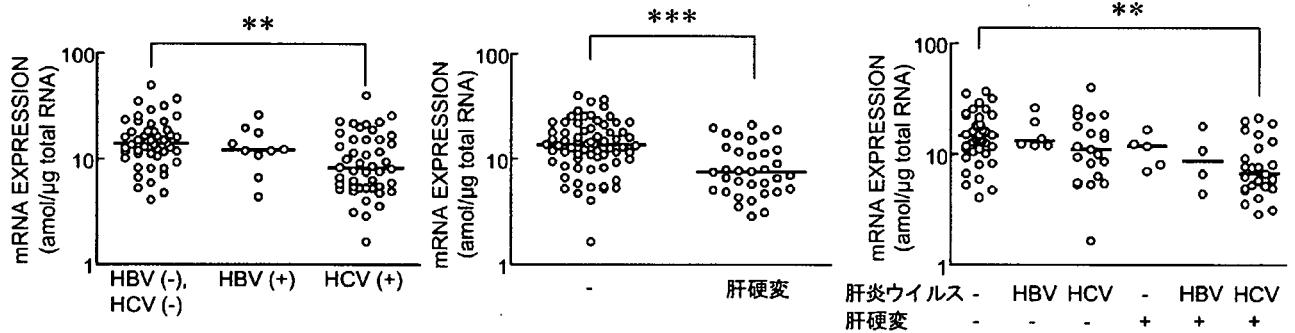


Fig. 3. rSNP 及びハプロタイプの mRNA 発現量に及ぼす影響 (*: $p < 0.05$)

(A) OCT1



(B) MRP4

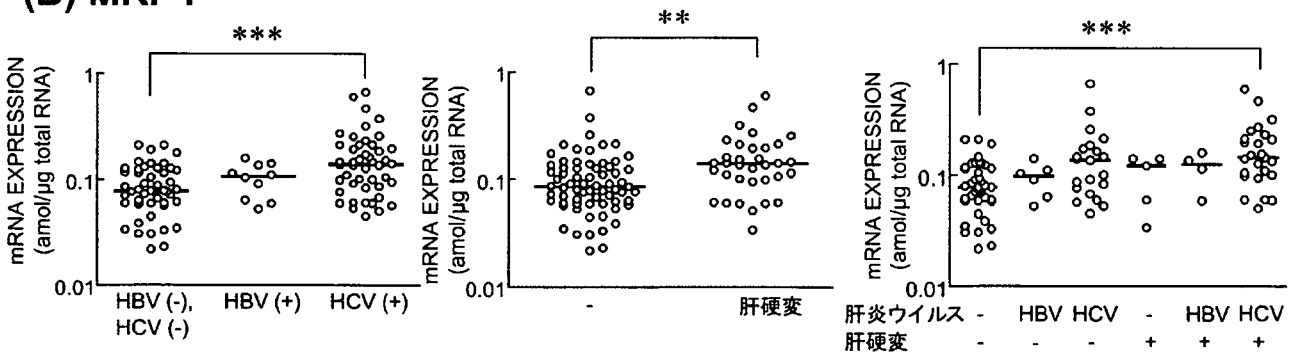


Fig. 4. 肝薬物トランスポータ発現量に及ぼす肝炎ウイルス感染、肝硬変の影響
(A) OCT1、(B) MRP4 (**: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$)

4) 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。

4-1) 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. 4)。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。

4-2) 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. 4)。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. 4)。

4-3) 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。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。

肝臓に発現する OCT1 のプロモーター解析を行ったところ、USF1 及び USF2 が E-box を介して基礎発現を制御していることが示された。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 OCT1 の発現量に影響を与えている可能性が考えられる。また、主任研究者乾によって制御されていることが明らかにされている。OCT1 の発現は肝特異的であることから、同じ USF1 によって転写が制御される OCT1 と OCT2 が、どのようなメカニズムで臓器特異性が決定されているの

か興味深い点である。腎臓での OCT2 の腎特異的な発現には E-box の低メチル化が関与していることが明らかにされている。このようなエピジェネティックな修飾が薬物トランスポータ発現量の個体差に関与している否かについては不明であるが、今後注目すべき因子と考えられる。

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 SNP 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。肝臓で高発現を示した OCT1 の基礎転写には、USF1/USF2 の関与していることが判明した。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. Yamanokuchi, S., Ikai, I., Nishitai, R., Matsushita, T., Sugimoto, S., Shiotani, T. and Yamaoka Y.: Asialo GM1 positive CD8⁺ T cells induce skin allograft rejection in the absence of the secondary lymphoid organs. *J. Surg. Res.*, **129**(1), 57-63 (2005)
2. Pawlik, T.M., Delman, K.A., Vauthey, J.N., Nagorney, D.M., Ng, I.O., Ikai, I., Yamaoka, Y., Belghiti, J., Lauwers, G.Y., Poon, R.T. and Abdalla, E.K.: Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: Implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.*, **11**(9), 1086-1092 (2005)
3. Yamagami, K., Hutter, J., Yamamoto, Y., Schauer, R.J., Enders, G., Leiderer, R., Ozen, O., Hammer, C., Yamaoka, Y. and Messmer, K.: Synergistic effects of brain death and liver steatosis on the hepatic microcirculation. *Transplantation*, **80**(4), 500-505 (2005)
4. Ng, K.K., Vauthey, J.N., Pawlik, T.M., Lauwers, G.Y., Regimbeau, J.M., Belghiti, J., Ikai, I., Yamaoka, Y., Curley, S.A., Nagorney, D.M., Ng, I.O., Fan, S.T. and Poon, R.T.: International Cooperative Study Group on Hepatocellular Carcinoma.:Is hepatic resection for large or multinodular hepatocellular carcinoma justified? Results from a multi-institutional database. *Ann. Surg. Oncol.*, **12**(5), 364-373 (2005)
5. Fujita, S., Ueda, Y., Ko, I.K., Paek, H.J., Sajiki, T., Ikai, I., Yamaoka, Y., Ikada, Y. and Iwata, H.: Functional evaluation of bioartificial liver using RT-PCR. *Biomed. Mater. Eng.*, **15**(3), 211-218 (2005)
6. Suetsugu, H., Iimuro, Y., Uehara, T., Nishio, T., Harada, N., Yoshida, M., Hatano, E., Son, G., Fujimoto, J. and Yamaoka, Y.: Nuclear factor κ B inactivation in the rat liver ameliorates short term total warm ischaemia/reperfusion injury. *Gut*, **54**(6), 835-842 (2005)
7. Sugimoto, S., Harada, K., Shiotani, T., Ikeda, S., Katsura, N., Ikai, I., Mizuguchi, T., Hirata, K., Yamaoka, Y. and Mitaka, T.: Hepatic organoid formation in collagen sponge of cells isolated from human liver tissues. *Tissue Eng.*, **11**(3-4), 626-633 (2005)
8. Yonezawa, K., Tolba, R.H., Wetter, A., Yamamoto, Y., Yamaoka, Y. and Minor, T.: L-carnitine could not improve hepatic warm ischemia-reperfusion injury despite ameliorated blood flow. *J. Surg. Res.*, **125**(1), 16-22 (2005)
9. Pawlik, T.M., Poon, R.T., Abdalla, E.K., Ikai, I., Nagorney, D.M., Belghiti, J., Kianmanesh, R., Ng, I.O., Curley, S.A., Yamaoka, Y., Lauwers, G.Y. and Vauthey, J.N.: Hepatectomy for hepatocellular carcinoma with major portal or hepatic vein invasion: results of a multicenter study. *Surgery*, **137**(4), 403-410 (2005)
10. Nishitai, R., Ikai, I., Shiotani, T., Katsura, N., Matsushita, T., Yamanokuchi, S., Matsuo, K., Sugimoto, S. and Yamaoka, Y.: Absence of PERV infection in baboons after transgenic porcine liver perfusion. *J. Surg. Res.*, **124**(1), 45-51 (2005)
11. Okuyama, H., Nakamura, H., Shimahara, Y., Uyama, N., Kwon, Y.W., Kawada, N., Yamaoka, Y. and Yodoi, J.: Overexpression of thioredoxin prevents thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *J. Hepatol.*, **42**(1), 117-123 (2005)
12. Kume, M., Banafsche, R., Yamamoto, Y., Yamaoka, Y., Nobiling, R., Gebhard, M.M. and Klar, E.: Dynamic changes of post-ischemic hepatic microcirculation improved by a pre-treatment of phosphodiesterase-3 inhibitor, milrinone. *J. Surg. Res.* **136**(2), 209-218 (2006)
13. Ikai, I., Takayasu, K., Omata, M., Okita, K., Nakanuma, Y., Matsuyama, Y., Makuuchi, M., Kojiro, M., Ichida, T., Arii, S. and Yamaoka, Y.; Liver Cancer Study Group of Japan.: A modified Japan Integrated Stage score for prognostic assessment in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.*, **41**(9), 884-892 (2006)
14. Takayasu, K., Arii, S., Ikai, I., Omata, M., Okita, K., Ichida, T., Matsuyama, Y., Nakanuma, Y., Kojiro, M., Makuuchi, M. and Yamaoka, Y.; Liver Cancer Study Group of Japan.: Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. *Gastroenterology*, **131**(2), 461-469 (2006)
15. Nishimura, T., Nishida, N., Komeda, T., Fukuda, Y., Ikai, I., Yamaoka, Y. and Nakao, K.:

Genome-wide semiquantitative microsatellite analysis of human hepatocellular carcinoma: discrete mapping of smallest region of overlap of recurrent chromosomal gains and losses. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **167**(1), 57-65 (2006)

16. 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)
17. 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。近年、これら腎薬物トランスポータ発現量の個体差が、薬物腎排泄の個体差に密接に関わっていることが明らかにされてきたが、発現量の個体差を規定する因子については未だ不明である。本研究では、腎薬物トランスポータ発現情報のデータ拡充と、主に腎臓に発現する有機イオントランスポータ（OCT2、OAT1、OAT3、OAT4）に焦点を当て、各トランスポータのプロモーター領域の遺伝子多型（rSNP）を解析し、発現量との相関について調べた。発現解析の結果、有機アニオントランスポータ（OAT3 及び OAT1）、尿酸トランスポータ（URAT1）や有機カチオントランスポータ（OCT2）の発現が高く、ペプチドトランスポータ（PEPT）並びに ABC トランスポータの発現は相対的に低かった。各トランスポータの発現量には最大約 100 倍以上の差が認められたが、年齢や性差をはじめとする臨床情報とトランスポータ発現量との間に関連は見出されなかった。プロモーター上流約 1 kb の rSNP 解析の結果、OCT2 において-578~-576 位の AAG を欠失する変異が見出された。この変異を有する群では変異を有さない群に比べ OCT2 発現量の低下傾向が認められ、また、レポーターアッセイにおいてもこの変異がプロモーター活性低下を引き起こした。一方、OAT1、OAT3 及び OAT4 では、プロモーター上流約 1 kb において発現量に影響を及ぼす変異は見出されなかった。これらの研究成果は、腎薬物トランスポータ発現量の個体差を解明する有用な情報になると考えられる。

A. 研究目的

腎臓は肝臓と共に、生体異物の解毒機構として重要な役割を果たしている。なかでも、近位尿細管に発現する有機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）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とが、近年の *in vitro* 及び *in vivo* 研究によって明らかになってきた。主任研究者乾らは、有機イオントランスポータ発現量の個体差が、薬物排泄の個体差に関連していることを明らかにし、発現量の個体差に影響を及ぼす因子の同定が次の課題として考えられている。これまで、尿細管傷害と対応すると考えられている尿タンパク量、N-

アセチルグルコサミド量、 β 2 ミクログロブリン量、肝臓型脂肪酸結合タンパク（L-FABP）と薬物トランスポータ発現量との相関について調べられているが、未だ有意な相関は得られていない。そこで、候補となる因子としてプロモーター領域の遺伝子多型（regulatory SNP: rSNP）に着目し、主に腎臓に発現する有機イオントランスポータ（OCT2、OAT1、OAT3、OAT4）の発現量と rSNP との関連について調べた。また OCT2 の腎特異的な発現に及ぼすエピジェネティックな効果についても検討を加えた。

上述したようにこれまでは、主に側底膜に発現する OCT や OAT の構造、機能、発現に関する *in vitro* 研究が進展し、それらの分子情報を基盤とした臨床研究も実施されるようになってきた。一方、刷子縁

膜側に発現するトランスポータの分子実体については長年不明の状態が続き、ゲノム情報などを用いた臨床研究を実施することは不可能であった。2005年に岡山大学の森山らのグループによって、大腸菌の多剤耐性に関与する Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) のほ乳類ホモログとして、ヒト腎より MATE1 が単離された。MATE1 の臓器分布、膜局在、輸送特性等から、MATE は刷子縁膜に発現する H⁺/有機カチオンアンチポータとして機能していることが想定された。そこで我々も、ヒト腎より MATE1 並びにそのアイソフォームである MATE2-K の cDNA を単離し、薬物輸送特性、ヒト腎における発現量、プロモーター解析、rSNP 解析を実施し、臨床研究を実施するための基盤整備に努めた。

B. 研究方法

1) ヒト正常腎組織における薬物トランスポータの発現量解析

根治的腎摘除が施行された腎腫瘍患者の正常組織部より、total RNA を精製し、リアルタイム PCR 法によって組織中の薬物トランスポータ発現量を定量した。

2) 有機イオントランスポータの rSNP 解析

腎腫瘍患者 63 名の正常部よりゲノム DNA を精製し、OCT2、OAT1、OAT3 及び OAT4 のプロモーター部位を PCR により増幅しダイレクトシークエンスを行うことによって、遺伝子多型解析を行った。rSNP が多数検出された OAT3 については、ハプロタイプ解析を行なった。また、各薬物トランスポータのプロモーター領域を含んだレポーターコンストラクトを用いて、遺伝子多型解析によって見出された変異体を作製した。レポーターコンストラクトは、培養腎上皮細胞 (LLC-PK₁ または OK) 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。

3) OCT1 及び OCT2 プロモーター領域のメチル化解析

腎がんあるいは肝がんと診断され、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 法により、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。

4) MATE1 及び MATE2-K の cDNA クローニング

MATE1 (AK001709) 及び MATE2 (NM_152908) の遺伝子情報をもとに設計したプライマーを用いて、PCR 法により各遺伝子を単離した。得られた産物は発現ベクター-pcDNA3.1 (+) にサブクローニングし、塩基配列を確認した。各遺伝子の臓器分布並びに患者個々の mRNA 発現量は、リアルタイム PCR 法により検討した。また、スプライシングバリエーションの検出は PCR 法により行った。さらに両トランスポータに対する特異的抗体を作成し、腎臓における膜局在を免疫組織染色により観察した。

5) MATE1 及び MATE2-K を介した薬物輸送解析

各遺伝子の発現ベクターをリポフェクション法によりヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に導入した。トランスフェクション 2 日後に、種々の放射性標識化合物を含むメディウム中でインキュベーションし、細胞内蓄積量を液体シンチレーション法により測定した。

6) MATE1 及び MATE2-K のプロモーター解析と rSNP 解析

両トランスポータのプロモーター領域として、転写開始部位から上流約 2.5 kb を human genomic DNA を鋳型として PCR 法により増幅し、pGL3-Basic ベクターにサブクローニングした。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、H⁺/有機カチオンアンチポータの発現していることが知られている LLC-PK₁ 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り調べた。

また腎不全患者 89 名分のゲノム DNA を精製し、MATE1 のプロモーター部位を PCR により増幅しダイレクトシークエンスを行うことによって、遺伝子多型解析を行った。また同定された rSNP を含むレポーターコンストラクトを作製し、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）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。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) ヒト正常腎組織における薬物トランスポータの発現量解析

本年度は、すでに本研究計画以前に収集された82例に加え最終的に109名の腎腫瘍患者について正常腎組織部における発現量を測定した。トランスポータはペプチドトランスポータ (PEPT) や有機イオントランスポータ (OCT/OCTN/OAT/URAT)、ABCトランスポータファミリー (MDR1/MRP) など、合計19種の薬物トランスポータについて検討した。その結果、有機アニオントランスポータ (OAT3 及び

OAT1)、尿酸トランスポータ (URAT1) や有機カチオントランスポータ (OCT2) の発現が相対的に高く、PEPT1、PEPT2 並びに ABC トランスポータの発現は相対的に低かった。各トランスポータの発現量には最大約100倍以上の差が認められた。これらの発現量の違いについて、患者情報との比較を行ったが、年齢や性差をはじめとする臨床情報とトランスポータ発現量との間に関連は見いだされなかった。従って、これらトランスポータ発現量の個人差についてさらなる精査が必要であると考えられた。

2) 有機イオントランスポータの rSNP 解析

プロモーター部位は mRNA の発現を制御しており、その部位における変異 (rSNP) が mRNA の発現量を変化させることが知られている。そこで発現解析で腎における発現の多かった OCT2、OAT1、OAT3、OAT4 について、rSNP の探索を行った。解析領域は転写開始部位より上流約1 kbとした。一方、性別、腎疾患、糖尿病により有機イオントランスポータの mRNA 発現量が変化することが報告されている。そこで、rSNP の発現量への影響を調べる際は、これら要因の影響を除くため、解析対象を根治的腎摘除が施行された腎腫瘍患者から、clear cell carcinoma と診断され、なおかつ腎不全、糖尿病を併発していない男性患者23名に絞り込んだ。

2-1) OCT2

-578~-576 位の AAG を欠失する変異が見出された。この変異は、今までに報告されていない変異であり、アレル頻度は8.7%であった。発現量への影響を調べたところ、この変異をホモ或いはヘテロでもつ群では変異を有さない群に比べ OCT2 発現量の低下傾向が認められた。また、ルシフェラーゼアッセイにおいてもこの変異が OCT2 のプロモーター活性を低下させることを確認した (Fig. 1)。

2-2) OAT1

今回検索した OAT1 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) OAT3

5つの変異が見出された。それらは、-659_-658 位に G が挿入される変異 (-659_-658insG、アレル頻度 81.7%)、-578 位の C が G に置換する変異 (-578C>G、アレル頻度 81.7%)、-515 位の A が C に置換する変異 (-515A>C、アレル頻度 84.1%)、-461 位の T が C

に置換する変異 (-461T>C、アレル頻度 26.2%)、-19 位の C が A に置換する変異 (-19C>A、アレル頻度 1.6%) であり、そのうち-19C>A は今までに報告されていない変異である。そして、これら5つの変異は5つのハプロタイプに分類された。発現量及びプロモーター活性への影響を調べたが、いずれの値もハプロタイプ間で有意な差は認められなかった。従って、これらの変異が発現量を変化させる可能性は低いと考えられた。

2-4) OAT4

-18 位の C が T に置換する変異が見つかり、アレル頻度は 3.2% であった。発現量及びプロモーター活性に与える-18C>T の影響を調べたが、有意な変化は見られなかった。

3) 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、主任研究者乾、分担研究者山岡によって、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、エピジェネ

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。

3-1) 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。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。

3-2) 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) について行った。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。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。

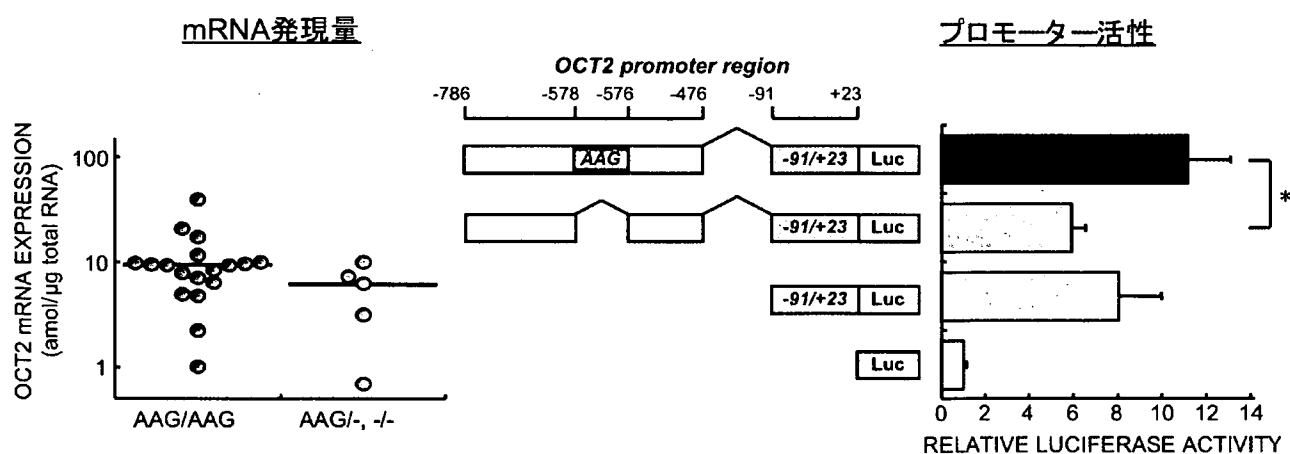
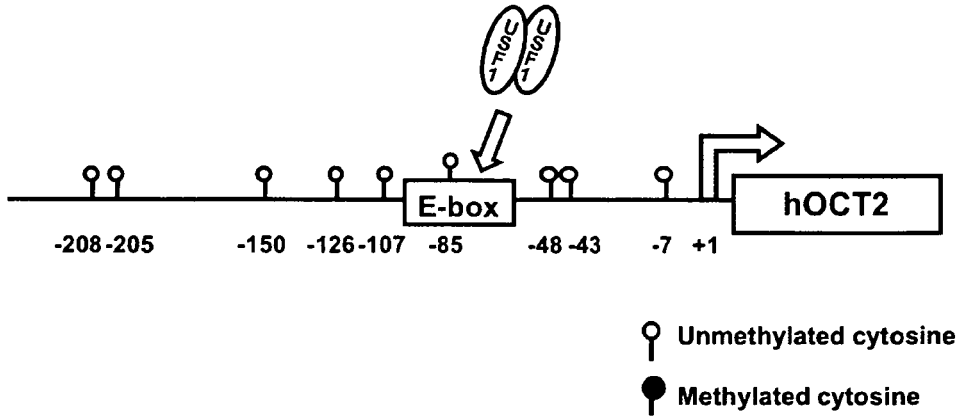


Fig. 1. OCT2 プロモーターの 3 塩基欠失変異 (-578_-576delAAG) の mRNA 発現量及びプロモーター活性に及ぼす影響

Kidney



Liver

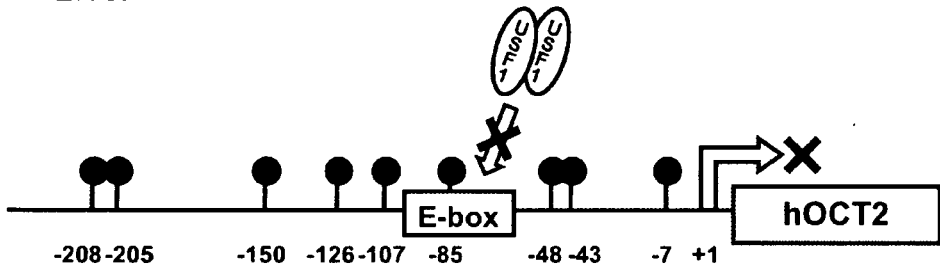


Fig. 2. *OCT2* 遺伝子の腎特異的な発現に及ぼすメチル化の影響。基礎転写因子 (USF1) の結合部位のメチル化頻度が腎臓では低いため、USF1 が結合し遺伝子発現が認められる。

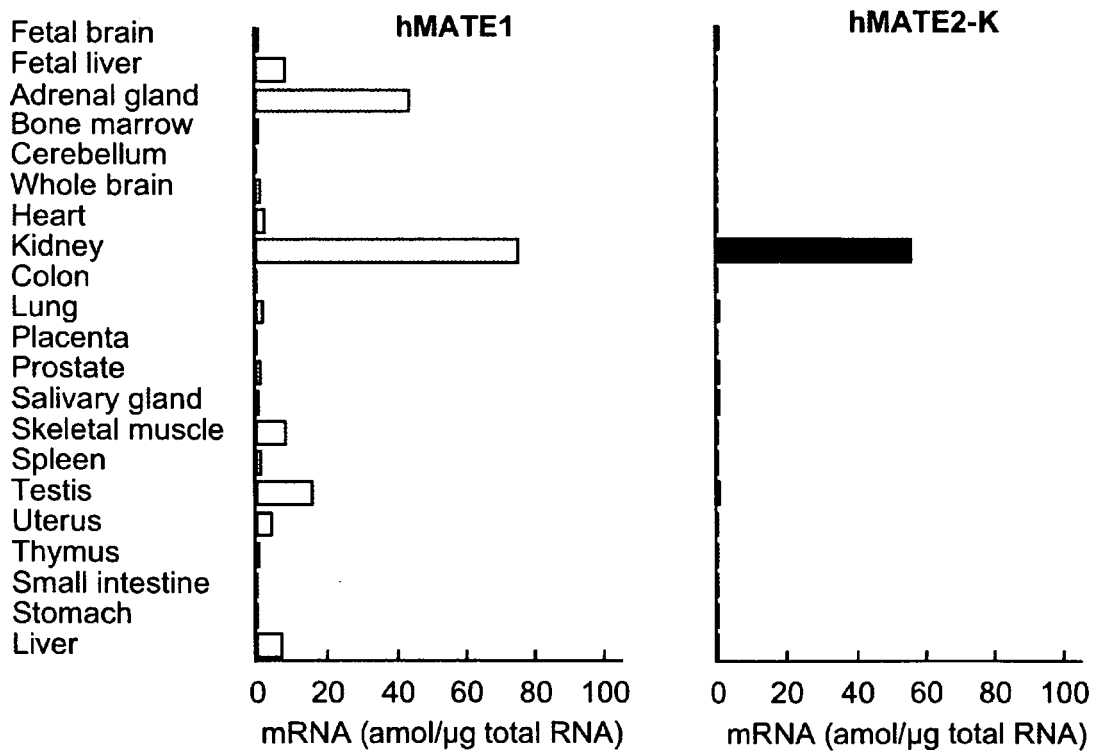


Fig. 3. MATE1 並びに MATE2-K の mRNA 発現分布