

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 OCT2 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)。

4) MATE1 及び MATE2-K の cDNA クローニング

単離した MATE1 cDNA の塩基配列は、既報の配列と一致した。他方、MATE2 に対するプライマーを用い MATE2 遺伝子の増幅を試みたところ、新たにそのスプライシングバリエーションである MATE2-K と MATE2-B の同定に至った。MATE2-K は MATE2 のエクソン7における 108 bp 欠損体であり、566 アミノ酸のタンパクをコードし、MATE1 とのアミノ酸相同性は 52%であった。MATE2-B 遺伝子では、MATE2 遺伝子に塩基が 46 bp 挿入されることによってフレームシフトが起こり、220 アミノ酸と短いタンパクをコードすることが判明した。組織分布を検討したところ、MATE1 は腎臓、副腎、肝臓、筋肉などに発現することがわかった (Fig. 3)。一方、MATE2-K 及び MATE2-B の発現は腎特異的であり、さらに PCR 法により MATE2-K 優位な発現が認められた (Fig. 3)。これまでに報告されている MATE2 (PNAS, 102, 17923-17928, 2005) の mRNA は検出されなかった。特異抗体を用いた免疫組織染色により、MATE1 及び MATE2-K は、側底膜側の有機カチオントランスポーター OCT2 と同様の腎内局在すなわち腎皮質の近位尿細管に発現することが判明し、刷子縁膜への局在が明示された。また、OCT1-3 並びに MATE1、MATE2-K の mRNA 発現量を腎腫瘍患者の正常腎組織 (N=82) を用いて測定したところ、MATE1 や MATE2-K の発現は OCT2 の発現よりは低

いことがわかった。

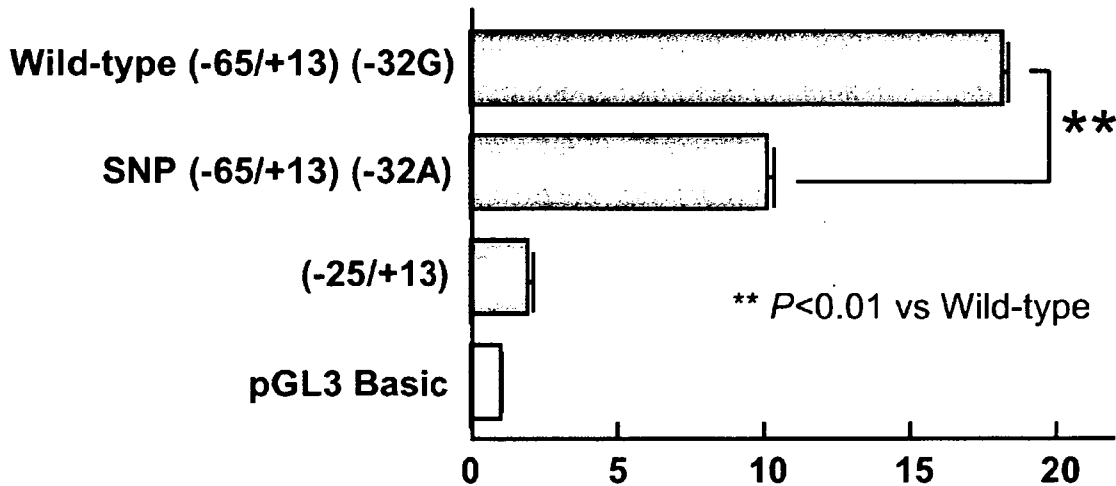
5) MATE1 及び MATE2-K を介した薬物輸送解析

MATE1 もしくは MATE2-K 発現細胞において H⁺/有機カチオンアンチポータの典型的基質である tetraethylammonium (TEA) の輸送が認められた。スプライシングバリエーションである MATE2-B による TEA 取り込み活性は観察されなかった。次に pH 依存性について検討を加えた。細胞外アルカリ化もしくは細胞内酸性化により作成した逆向きの H⁺勾配によって、両トランスポーターを介した TEA 輸送は促進された。さらに両トランスポーターの薬物認識特性について検討した結果、尿細管分泌を受けることが報告されているカチオン性薬物の経口糖尿病治療薬メトホルミン、抗胃潰瘍薬シメチジン、抗不整脈薬プロカインアミドの細胞内取り込みは、MATE1 および MATE2-K 発現により増大した。また両性イオン型抗生物質であるセファレキシンは MATE1 によって輸送されたが、MATE2-K による輸送は認められなかった。

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

6-1) MATE1

MATE1 の基礎転写に重要な部位を調べるために、deletion construct を用いて検討を行った。その結果、転写開始部位より上流 70 bp 付近を欠損させると著しい転写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、2つの Sp1 推定結合領域 (GC box) が存在した。Sp1 結合阻害薬である mithramycin A によってプロモーター活性が減少し、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変異を導入したところ、どちらの変異体においてもプロモーター活性の減少が確認された。さらに、ゲルシフトアッセイにより GC box に Sp1 の結合することが明らかとなった。従って、MATE1 の基礎転写には Sp1 が重要な役割を果たしていることが示された。



Wild

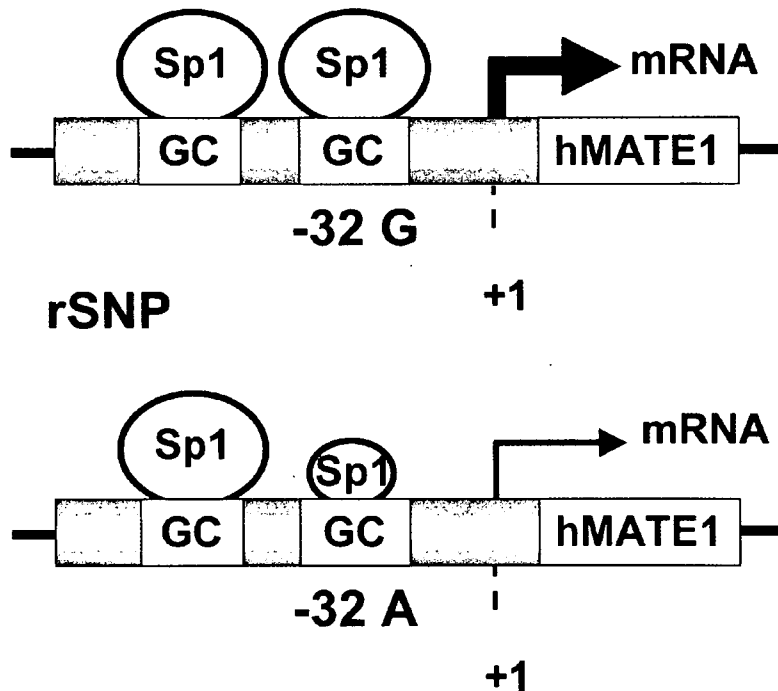


Fig. 4. *MATE1* 遺伝子の rSNP (G-32A) のプロモーター活性に及ぼす影響と模式図.

MATE1 の rSNP 解析を行ったところ、-32 位の G が A 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 1.7%であった。この rSNP の基礎転写に及ぼす影響を調べたところ、wild type に比べて顕著に活性が減少した (Fig. 4)。また Sp1 の結合性についてゲルシフトアッセイによって検討した結果、SNP を有するオリゴヌクレオチドでは Sp1 の結合性が低下するこ

とがわかった。従って、*MATE1* の rSNP (-32G>A) によって、*MATE1* の発現量が低下し、*MATE1* によって輸送される薬物の腎動態に影響を及ぼすことが示唆された。

6-2) *MATE2-K*

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、MATE1と同様にいずれの領域にも Sp1 推定結合領域である GC box が存在した。Sp1 結合阻害薬である mithramycin A によってプロモーター活性が減少し、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 GC Box 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 % と高頻度であった。しかし、この rSNP を有していても、wild type と同程度のプロモーター活性を示した。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。

D. 考察

これまでの研究から、腎側底膜に発現する有機アニオントランスポータ OAT3 の発現量が、アニオン性抗生物質セファゾリンの腎排泄速度を規定することが明らかになっている。従って、薬物トランスポータ発現量の個体差を規定する因子を解明することは、個人の薬物排泄能力に応じた個々の薬物療法へとつながることが期待される。そこで本研究では、腎臓での薬物トランスポータの発現解析、rSNP 解析、新規薬物トランスポータの単離と分子・ゲノム情報の収集に取り組み、薬物トランスポータの発現量の個体差を生み出す因子の同定を試みた。

発現解析の結果、有機アニオントランスポータ群の発現量が最も高く、次いで有機カチオントランスポータ群の発現量が高かった。これらのトランスポータ発現量には 100 倍以上の個人差が認められるものの、年齢や性差などとは相関が認められなかった。また、これまでの報告から翻訳領域における終始コドンへの遺伝子変異なども報告されていないことから、これら発現量の個体差には転写制御領域における遺伝子多型が影響する可能性が考えられた。

腎臓に発現する代表的な有機イオントランスポータ (OCT2、OAT1、OAT3、OAT4) のプロモーターの上流約 1 kb について、rSNP 解析を行った。その結果、OCT2 で上流約 600 bp のプロモーター部位において、3 塩基の欠失する変異が見出された。腎 OCT2 mRNA 発現量や *in vitro* プロモーター解析によって、これらの変異を有すると OCT2 の発現が低下することが示唆された。一方、OAT1、OAT3、OAT4 の発現量に影響を及ぼすと考えられる rSNP は見出されなかった。多くの rSNP は近位プロモーターに存在していることが多く、本研究では 1 kb より上流の rSNP 解析は実施しなかったが、抗がん剤イリノテカンの代謝に関与する UGT1A1 では、エンハンサー領域に存在する rSNP (-3263T>G: UGT1A1*60) が、UGT1A1 の発現量を低下させることが知られており、上流域における rSNP の探索も近位プロモーターの解析と同様に重要であると考えられる。

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。また、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。

本研究において、長年分子実体の不明であった刷子縁膜に局在する 2 種類の H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE1 及び MATE2-K) の単離に成功した。両トランスポータの輸送機能解析から、尿細管分泌を受ける主要なカチオン性薬物のメトホルミン、シメチジン、プロカインアミドが MATEs の基質となることが示された。MATEs の基質認識特性及び腎臓

における発現分布は側底膜側 OCT2 と類似しており、OCT2 を介して取り込まれた薬物は MATE1 および MATE2-K を介して尿細管管腔へ分泌されると考えられる。したがって、OCT2 及び MATE1 と MATE2-K はカチオン性薬物の尿細管分泌能を規定する重要な分子となることが示唆される。主任研究者乾によって既に、極性を有する上皮細胞に OCT1 あるいは OCT2 と MATE1 を共発現させた経上皮輸送解析系が構築されている（主任研究者乾の項参照）。

MATE1 並びに MATE2-K の転写制御機構として、近位プロモーター領域に存在する 2 つの GC box に Sp1 が結合し、基礎発現を調節していることが判明した。また、MATE1 では下流の GC box において-32 位の G が A に置換する rSNP が存在することが判明し、プロモーター活性に影響を及ぼすことが明らかになった。一方、MATE2-K では、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メトホルミンの臨床薬物動態解析 (N=16) においては、MATE1 rSNP (-32G>A) は見出されなかった。また MATE2-K 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

腎薬物トランスポーター発現解析 (N=109) の結果、有機アニオントランスポーター群の発現量が最も高く、次いで有機カチオントランスポーター群であり、発現量には最大 100 倍以上の個体差が認められた。OCT2、OAT1、OAT3、OAT4 の rSNP 探索を行ったところ、OCT2 において発現量に影響を及ぼすと考えられる遺伝子変異を見出した。また、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。新規薬物トランスポーターとして、H⁺/有機カチオンアンチポーター (MATE1 並びに MATE2-K) の単離に成功し、カチオン性薬物の排泄の規定分子を同定した。組織分布及び輸送機能解析の結果から、側底膜側の OCT2 とともに MATE1 及び MATE2-K が協調してカチオン性薬物の尿細管分泌を媒介することが示唆された。さらに、MATE1 の基礎転写に Sp1 が関与することを示し、加えて MATE1 の転写活性に影響を与える Sp1 結合部位の rSNP (-32G>A) を見出した。MATE2-K においてもアレル頻度の高い Sp1 結合部位の rSNP (-51C>T) を見出したが、

プロモーター活性や mRNA 発現量には影響を及ぼさなかった。本研究では、腎薬物トランスポーターの発現制御に関する新知見を見出し、イオン性薬物の腎排泄の個体差を分子的に明らかにしていく上で重要な基礎的情報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. Kanematsu, A., Yamamoto, S., Iwai-Kanai, E., Kanatani, I., Imamura, M., Adam, R.M., Tabata, Y. and Ogawa, O.: Induction of smooth muscle cell-like phenotype in marrow-derived cells among regenerating urinary bladder smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.*, **166**(2), 565-573 (2005)
2. Kamoto, T., Isogawa, Y., Shimizu, Y., Minamiguchi, S., Kinoshita, H., Kakehi, Y., Mitsumori, K., Yamamoto, S., Habuchi, T., Kato, T. and Ogawa, O.: Association of a genetic polymorphism of the E-cadherin gene with prostate cancer in a Japanese population. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **35**(3), 158-161 (2005)
3. Okada, Y., Yamamoto, S., Akamatsu, S., Kanamaru, S., Ito, N., Kinoshita, H., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Primary transitional carcinoma of the remaining ureter after nephrectomy for pyonephrosis: a case report. *Hinyokika Kyo*, **51**(2), 101-103 (2005)
4. Matsui, Y., Nishiyama, H., Watanabe, J., Teramukai, S., Ono, Y., Ohshima, S., Fujimoto, K., Hirao, Y., Fukushima, M. and Ogawa, O.: The current status of perioperative chemotherapy for invasive bladder cancer: a multiinstitutional retrospective study in Japan. *Int. J. Clin. Oncol.*, **10**(2), 133-138 (2005)
5. Zhenhua, L., Tsuchiya, N., Narita, S., Inoue, T., Horikawa, Y., Kakinuma, H., Kato, T., Ogawa, O. and Habuchi, T.: CYP3A5 gene polymorphism and risk of prostate cancer in a Japanese population. *Cancer Lett.*, **225**(2), 237-243 (2005)
6. Watanabe, J., Nishiyama, H., Kawanishi, H., Ito, M., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Clinical

- evaluation of serum p53 antibodies in patients with upper urinary tract tumors. *J. Urol.*, **174**(1), 73-75 (2005)
7. Megumi, Y., Miyauchi, Y., Sakurai, H., Nobeyama, H., Lorick, K., Nakamura, E., Chiba, T., Tanaka, K., Weissman, A.M., Kirisako, T., Ogawa, O. and Iwai, K.: Multiple roles of Rbx1 in the VBC-Cul2 ubiquitin ligase complex. *Genes Cells*, **10**(7), 679-691 (2005)
 8. Okinami, T., Yamamoto, S., Yoshida, H., Ito, N., Kamoto, T. and Ogawa, O.: A case of accelerated acute rejection in kidney transplantation rescued by plasma exchange. *Hinyokika Kyo*, **51**(5), 325-329 (2005)
 9. Inoue, T., Segawa, T., Shiraishi, T., Yoshida, T., Toda, Y., Yamada, T., Kinukawa, N., Kinoshita, H., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Androgen receptor, Ki67, and p53 expression in radical prostatectomy specimens predict treatment failure in Japanese population. *Urology*, **66**(2), 332-337 (2005)
 10. Niu, Z., Ito, M., Awakura, Y., Takahashi, T., Nakamura, E., Ito, N. and Ogawa, O.: The expression of NOV and WT1 in renal cell carcinoma: a quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *J. Urol.*, **174**(4 Pt 1), 1460-1462 (2005)
 11. Kanematsu, A., Yamamoto, S., Yoshino, K., Ishitoya, S., Terai, A., Sugita, Y., Ogawa, O. and Tanikaze, S.: Renal scarring is associated with nonsecretion of blood type antigen in children with primary vesicoureteral reflux. *J. Urol.*, **174**(4 Pt 2), 1594-1597
 12. Kobayashi, T., Nakamura, E., Ogura, K. and Ogawa, O.: Incidence of adrenal involvement and assessing adrenal function in patients with renal cell carcinoma: is ipsilateral adrenalectomy indispensable during radical nephrectomy? *BJU Int.*, **96**(6), 916 (2005)
 13. Higashi, S., Matsui, Y., Takahashi, T., Nishiyama, H., Ito, N., Yamamoto, S., Kamoto, T. and Ogawa, O.: The influence over the long-term prognosis of BCG therapy and the surgical treatment in superficial bladder cancer treatment. *Hinyokika Kyo*, **51**(8), 529-531 (2005)
 14. Shioji, G., Ezura, Y., Nakajima, T., Ohgaki, K., Fujiwara, H., Kubota, Y., Ichikawa, T., Inoue, K., Shuin, T., Habuchi, T., Ogawa, O., Nishimura, T. and Emi, M.: Nucleotide variations in genes encoding plasminogen activator inhibitor-2 and serine proteinase inhibitor B10 associated with prostate cancer. *J. Hum. Genet.*, **50**(10), 507-515 (2005)
 15. Kobayashi, T., Kinoshita, H., Nishizawa, K., Mitsumori, K., Ogawa, O. and Kamoto, T.: Age-associated increase of prostate-specific antigen in a high level of men visiting urological clinics. *Int. J. Urol.*, **12**(8), 733-738 (2005)
 16. Segawa, T., Kamoto, T., Kinoshita, H., Kunishima, Y., Yoshimura, K., Ito, A., Takahashi, T., Higashi, S., Nakamura, E., Nishiyama, H., Ito, N., Yamamoto, S., Habuchi, T. and Ogawa, O.: Monthly paclitaxel and carboplatin with oral estramustine phosphate in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Int. J. Clin. Oncol.*, **10**(5), 333-337 (2005)
 17. Yoshida, T., Kinoshita, H., Segawa, T., Nakamura, E., Inoue, T., Shimizu, Y., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Antiandrogen bicalutamide promotes tumor growth in a novel androgen-dependent prostate cancer xenograft model derived from a bicalutamide-treated patient. *Cancer Res.*, **65**(21), 9611-9616 (2005)
 18. Oka, H., Chatani, Y., Kohno, M., Kawakita, M. and Ogawa, O.: Constitutive activation of the 41- and 43-kDa mitogen-activated protein (MAP) kinases in the progression of prostate cancer to an androgen-independent state. *Int. J. Urol.*, **12**(10), 899-905 (2005)
 19. Sawada, A., Segawa, T., Nakanishi, S., Kinoshita, H., Yamamoto, S., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Prostate cancer with penile metastasis: a case report. *Hinyokika Kyo*, **51**(11), 771-773 (2005)
 20. Teramukai, S., Nishiyama, H., Matsui, Y., Ogawa, O. and Fukushima, M.: Evaluation for surrogacy of end points by using data from observational studies: tumor downstaging for evaluating neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer. *Clin. Cancer Res.*, **12**(1), 139-143 (2006)
 21. Ito, M., Nishiyama, H., Watanabe, J., Kawanishi, H., Takahashi, T., Kamoto, T., Habuchi, T. and Ogawa, O.: Association of the PIG3 Promoter

- Polymorphism with Invasive Bladder Cancer in a Japanese Population. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **36**(2), 116-120 (2006)
22. Takahashi, T., Higashi, S., Nishiyama, H., Segawa, T., Nakamura, E., Kinoshita, H., Itoh, N., Yamamoto, S., Kamoto, T., Habuchi, T. and Ogawa, O.: Biweekly Paclitaxel and gemcitabine for patients with advanced urothelial cancer ineligible for cisplatin-based regimen. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **36**(2), 104-108 (2006)
 23. Nishizawa, K., Kanno, T., Takahashi, T., Nishiyama, H., Ito, A., Ito, N., Yamamoto, S., Kamoto, T., Ogawa, O., Kotani, H., Adachi, Y., Sakurai, T. and Manabe, T.: A case of retroperitoneal dedifferentiated liposarcoma initially diagnosed as malignant fibrous histiocytoma: a case report. *Hinyokika Kyo*, **52**(1), 11-14 (2005)
 24. Nakamura, E., Abreu-E-Lima, P., Awakura, Y., Inoue, T., Kamoto, T., Ogawa, O., Kotani, H., Manabe, T., Zhang, G.J., Kondo, K., Nose, V. and Kaelin, W.G. Jr.: Clusterin is a secreted marker for a hypoxia-inducible factor-independent function of the von hippel-lindau tumor suppressor protein. *Am. J. Pathol.*, **168**(2), 574-584 (2006)
 25. Teramukai, S., Nishiyama, H., Matsui, Y., Ogawa, O. and Fukushima, M.: Evaluation for surrogacy of end points by using data from observational studies: tumor downstaging for evaluating neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer. *Clin. Cancer Res.*, **12**(1), 139-143 (2006)
 26. Awakura, Y., Ito, N., Nakamura, E., Takahashi, T., Kotani, H., Mikami, Y., Manabe, T., Kamoto, T., Habuchi, T. and Ogawa O.: Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms and renal cell carcinoma in a Japanese population. *Cancer Lett.*, **241**(1), 59-63 (2006)
 27. Nakamura, E., Abreu-E-Lima, P., Awakura, Y., Inoue, T., Kamoto, T., Ogawa, O., Kotani, H., Manabe, T., Zhang, G.J., Kondo, K., Nose, V. and Kaelin, W.G. Jr.: Clusterin is a secreted marker for a hypoxia-inducible factor-independent function of the von hippel-lindau tumor suppressor protein. *Am. J. Pathol.*, **168**(2), 574-584 (2006)
 28. Ito, M., Nishiyama, H., Watanabe, J., Kawanishi, H., Takahashi, T., Kamoto, T., Habuchi, T. and Ogawa O.: Association of the PIG3 promoter polymorphism with invasive bladder cancer in a Japanese population. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **36**(2), 116-120 (2006)
 29. Watanabe, J., Nishiyama, H., Matsui, Y., Ito, M., Kawanishi, H., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Dicoumarol potentiates cisplatin-induced apoptosis mediated by c-Jun N-terminal kinase in p53 wild-type urogenital cancer cell lines. *Oncogene*, **25**(17), 2500-2508 (2006)
 30. Tsuchiya, N., Mishina, M., Narita, S., Kumazawa, T., Inoue, T., Horikawa, Y., Kakinuma, H., Yuasa, T., Matsuura, S., Satoh, S., Ogawa, O. and Habuchi, T.: Association of XRCC1 gene polymorphisms with the susceptibility and chromosomal aberration of testicular germ cell tumors. *Int. J. Oncol.*, **28**(5), 1217-1223 (2006)
 31. Tsuchiya, N., Wang, L., Suzuki, H., Segawa, T., Fukuda, H., Narita, S., Shimbo, M., Kamoto, T., Mitsumori, K., Ichikawa, T., Ogawa, O., Nakamura, A. and Habuchi, T.: Impact of IGF-I and CYP19 gene polymorphisms on the survival of patients with metastatic prostate cancer. *J. Clin. Oncol.*, **24**(13), 1982-1989 (2006)
 32. Sato, E., Yano, I., Jiko, M., Takahashi, K., Motohashi, H., Masuda, S., Katsura, T., Nishiyama, H., Segawa, T., Ito, N., Kamoto, T., Ogawa, O. and Inui, K.: Evaluation of Calvert's formula for dosage adjustment of carboplatin in Japanese patients with hormone refractory prostate cancer. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**(7), 1441-1444 (2006)
 33. Inoue, T., Segawa, T., Shiraishi, T., Yamada, T., Kinukawa, N., Yoshida, T., Toda, Y., Shimizu, Y., Nakamura, E., Kinoshita, H., Kamoto, T. and Ogawa, O.: High-grade and hormone-treated prostate cancer express high levels of thymidylate synthase. *BJU Int.*, **98**(1), 197-200 (2006)
 34. 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)

35. Kawanishi, H., Takahashi, T., Ito, M., Watanabe, J., Higashi, S., Kamoto, T., Habuchi, T., Kadowaki, T., Tsujimoto, G., Nishiyama, H. and Ogawa, O.: High throughput comparative genomic hybridization array analysis of multifocalurothelial cancers. *Cancer Sci.*, **97**(8), 746-752 (2006)
36. Inoue, T., Yoshida, T., Shimizu, Y., Kobayashi, T., Yamasaki, T., Toda, Y., Segawa, T., Kamoto, T., Nakamura, E. and Ogawa, O.: Requirement of androgen-dependent activation of protein kinase C ζ for androgen-dependent cell proliferation in LNCaP cells and its roles in transition to androgen-independent cells. *Mol. Endocrinol.*, **20**(12), 3053-3069 (2006)
37. Sugino, Y., Usui, T., Okubo, K., Nagahama, K., Takahashi, T., Okuno, H., Hatayama, H., Ogawa, O., Shimatsu, A. and Nishiyama, H.: Genotyping of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency presenting as male infertility: Case report and literature review. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **23**(9-10), 377-380 (2006)
38. Kanatani, I., Ikai, T., Okazaki, A., Jo, J.I., Yamamoto, M., Imamura, M., Kanematsu, A., Yamamoto, S., Ito, N., Ogawa, O. and Tabata, Y.: Efficient gene transfer by pullulan-spermine occurs through both clathrin- and raft/caveolae-dependent mechanisms. *J. Control. Release.*, **116**(1), 75-82 (2006)
39. Kobayashi, T., Kawakita, M., Terachi, T., Habuchi, T., Ogawa, O. and Kamoto, T.: Significance of elevated preoperative alpha-fetoprotein in postchemotherapy residual tumor resection for the disseminated germ cell tumors. *J. Surg. Oncol.*, **94**(7), 619-623 (2006)
40. 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)
41. 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)
42. 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)
43. 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)
44. 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)
45. 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)
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. 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).
48. Kanematsu, A., Yamamoto, S. and Ogawa, O.: Changing concepts of bladder regeneration. *Int. J. Urol.*, **14**(8), 673-678 (2007)
49. 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).
50. 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)
 51. 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)
 52. 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)
 53. 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)
 54. 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)
 55. 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)
 56. 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)
 57. 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)
 58. 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)
 59. 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)
 60. 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)
 61. 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)
 62. 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)
 63. 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)
 64. 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)

2. 学会発表

1. 中村英二郎、William G. Kaelin、小川 修：細胞培養上清中蛋白質の解析による腎細胞癌新規血清腫瘍マーカーの同定. 第93回日本泌尿器科学会総会 (2005年4月、東京)
2. Ito, N., Kamoto, T. and Ogawa O.: Running sutures of renal parenchyma with Lapraty in laparoscopic partial nephrectomy. 24th World Congress of Endourology and SWL (August 2005, Amsterdam)
3. 中村英二郎、川西博晃、栗倉康夫、William G. Kaelin、小川 修：プロテオーム解析による von Hippel-Lindau (VHL) 病の表現型成因の解明. 第64回日本癌学会総会 (2005年9月、札幌)
4. 栗倉康夫、高橋毅、中村英二郎、伊藤哲之、小川修、門脇正史、辻本豪三、秋山英雄、妙本陽、信正均：DNAチップを用いた淡明腎細胞癌における予後予測マーカーの探索. 第64回日本癌学会総会 (2005年9月、札幌)
5. 伊藤哲之、清川岳彦、西山博之、賀本敏行、小川 修、小山 貴、梅岡成章、玉井 賢：Virtual laparoscopy の試みー標準術式(体腔鏡下腎摘除術)遂行のための術前 simulation. 第5回日本VR医学会 (2005年9月、東京)
6. Ito, N., Nishiyama, T., Kamoto, T. and Ogawa O.: Specimen removal from phannenstiel incision in laparoscopic and retroperitoneoscopic radical nephrectomy. The 2nd Annual Meeting of the East Asaian Society of Endourology (October 2005, Jeju Island, Korea)
7. 伊藤哲之、賀本敏行、小川 修：鏡視下腎副腎摘除標準術式におけるモニター上の臓器の位置関係のコンセンサス. 第19回日本Endourology・ESWL学会総会 (2005年11月、東京)
8. 伊藤哲之、西澤恒二、吉村耕治、西山博之、賀本敏行、小川 修：体腔鏡下腎摘除術の標準術式. 第18回日本内視鏡外科学会 (2005年12月、東京)
9. 伊藤将彰、西山博之、松井茂之、川西博晃、松井喜之、高橋 毅、賀本敏行、小川 修：P21-activated kinase (Pak) 1 の表在性膀胱癌再発における役割の解析. 第15回泌尿器科分子・細胞研究会 (2006年2月、京都)
10. 井上貴博、中村英二郎、吉田 徹、清水洋祐、清川岳彦、賀本敏行、小川 修：P70 S6 Kinase経路は前立腺癌細胞のアンドロゲン非依存性増殖能獲得に関与する. 第15回泌尿器科分子・細胞研究会 (2006年2月、京都)
11. 清水洋祐、清川岳彦、吉田 徹、中村英二郎、井上貴博、小林 恭、賀本敏行、小川 修：新規アンドロゲン依存性前立腺癌 Xenograft は抗アンドロゲン剤ビカルタミドにて増殖刺激を受ける. 第5回ステロイドホルモンを考える会 (2006年3月、東京)
12. Matsui, Y., Watanabe, J., Nishiyama, H., Kawanishi, H., Ito, M., Takahashi, T., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Triptolide (PG490)-mediated sensitization of urothelial cancer cells to cisplatin induced apoptosis. 21nd Annual Congress of European Association of Urology (April 2006, Paris)
13. Kobayashi, T., Inoue, T., Shimizu, Y., Segawa, T., Kamoto, T., Nakamura, E. and Ogawa, O.: Rheb, a novel small G-protein of Ras superfamily, is associated with proliferation in human prostate cancer cell lines. 21nd Annual Congress of European Association of Urology (April 2006, Paris)
14. 松井喜之、渡部 淳、西山博之、川西博晃、伊藤将彰、高橋 毅、賀本敏行、小川 修：尿路上皮癌における新規標的分子 Galectin 7 の同定と解析. 第94回日本泌尿器科学会総会 (2006年4月、福岡)
15. 川西博晃、中村英二郎、松井喜之、伊藤将彰、山崎俊成、高橋毅、西山博之、賀本敏行、辻本豪三、妙本 陽、秋山英雄、信正 均、小川 修：細胞培養上清のプロテオーム解析による尿路上皮癌増殖因子の同定. 第94回日本泌尿器科学会総会 (2006年4月、福岡)
16. 山崎俊成、中村英二郎、川西博晃、栗倉康夫、井上貴博、神波大己、伊藤哲之、賀本敏行、小川 修：VHL 遺伝子変異に伴うシグナル伝達経路の活性化と腎細胞癌増殖への関与. 第94回日本泌尿器科学会総会 (2006年4月、福岡)
17. 栗倉康夫、高橋毅、中村英二郎、伊藤哲之、

- 賀本敏行、小川 修、小谷泰一、門脇正史、辻本豪三、秋山英雄、妙本 陽、信正 均：DNA チップを用いた淡明腎細胞癌における予後マーカーの探索。第 94 回日本泌尿器科学会総会 (2006 年 4 月、福岡)
18. 清水洋祐、清川岳彦、中村英二郎、井上貴博、吉田徹、賀本敏行、白石泰三、小川 修：ヒト前立腺癌における Akt 及び活性型 Akt 発現の予後因子としての解析。第 94 回日本泌尿器科学会総会 (2006 年 4 月、福岡)
19. 小林 恭、中村英二郎、井上貴博、清水洋祐、清川岳彦、賀本敏行、小川 修：ヒト前立腺癌細胞株における S6K 経路上流シグナル伝達分子の解析。第 94 回日本泌尿器科学会総会 (2006 年 4 月、福岡)
20. Matsui, Y., Kawanishi, H., Ito, M., Watanabe, J., Nishiyama, H., Ogawa, O., Ueda, S., Kuwabara, I. and Liu, FT.: Impact of galectin 7 expression on the chemosensitivity of urothelial cancer. The American Urological Association (AUA)'s 2006 Annual Meeting (May 2006, Atlanta)
21. 川西博晃、中村英二郎、松井喜之、伊藤将彰、山崎俊成、高橋 毅、西山博之、賀本敏行、妙本 陽、秋山英雄、信正 均、小川 修：細胞培養上清蛋白ショットガンプロテオミクスによる膀胱癌浸潤関連因子の同定。第 2 回日本臨床プロテオーム研究会 (2006 年 7 月、東京)
22. 小林 恭、中村英二郎、井上貴博、清水洋祐、寺田直樹、賀本敏行、小川 修：S6 kinase signal pathways in human prostate cancer cells. 第 7 回文部省特定領域「がん」5 領域 若手研究者ワークショップ (2006 年 8 月、蓼科)
23. 松井喜之、西山博之、川西博晃、高橋 毅、賀本敏行、小川 修：尿路上皮癌における NQO1 修飾による抗癌剤感受性増強機序の解析。第 65 回日本癌学会学術総会 (2006 年 9 月、横浜)
24. 川西博晃、中村英二郎、松井喜之、伊藤将彰、山崎俊成、高橋 毅、西山博之、賀本敏行、妙本 陽、秋山英雄、信正 均、小川 修：細胞培養上清蛋白ショットガンプロテオミクスによる膀胱癌浸潤関連因子の同定。第 65 回日本癌学会学術総会 (2006 年 9 月、横浜)
25. 山崎俊成、中村英二郎、川西博晃、栗倉康夫、神波大己、伊藤哲之、賀本敏行、小川 修、田中祥徳、鄭基晩、秋山英雄、信正 均：血清プロテオーム解析による腎細胞癌腫瘍マーカーの探索。第 65 回日本癌学会学術総会 (2006 年 9 月、横浜)
26. 栗倉康夫、高橋 毅、中村英二郎、伊藤哲之、賀本敏行、小川 修、小谷泰一、門脇正史、辻本豪三、秋山英雄、妙本 陽、信正 均：DNA チップを用いた淡明腎細胞癌における予後マーカーの探索。第 65 回日本癌学会学術総会 (2006 年 9 月、横浜)
27. Shang, D., Ito, N., Watanabe, J., Awakura, Y., Nishiyama, H., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Synergy of interferon- α and 5-fluorouracil in human renal cell carcinoma requires p53 activity. 第 65 回日本癌学会学術総会 (2006 年 9 月、横浜)
28. 清水洋祐、中村英二郎、清川岳彦、吉田 徹、井上貴博、小林 恭、木下秀文、賀本敏行、小川 修：新規アンドロゲン依存性前立腺癌 xenograft モデルの確立。第 65 回日本癌学会学術総会 (2006 年 9 月、横浜)
29. 小林 恭、中村英二郎、寺田直樹、清水洋祐、井上貴博、賀本敏行、小川 修：ヒト前立腺癌細胞株における S6K 経路制御機構の解析。第 65 回日本癌学会学術総会 (2006 年 9 月、横浜)
30. Shang, D., Ito, N., Watanabe, J., Awakura, Y., Nishiyama, H., Kamoto, T. and Ogawa, O.: Synergy of interferon- α and 5-fluorouracil in human renal cell carcinoma requires p53 activity. 第 44 回日本癌治療学会総会学術集会 (2006 年 10 月、東京)

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
寺田智祐	ペプチドトランスポーターPEPTs	玉井郁巳	創薬動態 医薬品創製のための考え方と最新事情	日本薬物動態学会	東京	2006	pp. 116-122
乾 賢一、土井俊夫 編著		乾 賢一、土井俊夫	改訂2版腎機能別薬剤使用マニュアル	じほう	東京	2006	
京都大学医学部附属病院薬剤部 編著		乾 賢一 (監修)	薬剤師が変える薬物治療2 -安全ながん治療とテーラーメイド医療に向けて-	じほう	東京	2007	
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
Kimura et al.	Metformin transport by renal basolateral organic cation transporter hOCT2.	Pharm. Res.	22(2)	255-259	2005
Habu et al.	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
Shimizu et al.	Increased protein level of PEPT1 intestinal H ⁺ /peptide cotransporter up-regulates absorption of glycylsarcosine	Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.	288(4)	G664-G670	2005

	and ceftibuten in 5/6 nephrectomized rats.				
Irie et al.	Computational modelling of H ⁺ -coupled peptide transport via human PEPT1.	J. Physiol. (Lond.)	565(2)	429-439	2005
Urakami et al.	Transcellular transport of creatinine in renal tubular epithelial cell line LLC-PK ₁ .	Drug Metab. Pharmacokinet.	20(3)	200-205	2005
Shimakura et al.	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
Ueo et al.	Human organic anion transporter hOAT3 is a potent transporter of cephalosporin antibiotics, in comparison with hOAT1.	Biochem. Pharmacol.	70(7)	1104-1113	2005
Kimura et al.	Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1.	Drug Metab. Pharmacokinet.	20(5)	379-386	2005
Nishio et al.	Modulation of P-glycoprotein expression in hyperthyroid rat tissues.	Drug Metab. Dispos.	33(11)	1584-1587	2005
Inoue et al.	Regulation of human peptide transporter 1 (PEPT1) in gastric cancer cells by anticancer drugs.	Cancer Lett.	230(1)	72-80	2005
Terada et al.	Expression profiles of various transporters for oligopeptides, amino acids and organic ions along the human digestive tract.	Biochem. Pharmacol.	70(12)	1756-1763	2005
Yonezawa et al.	Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat.	Biochem. Pharmacol.	70(12)	1823-1831	2005
Sakurai et al.	Pharmacokinetic significance of renal OAT3 (SLC22A8) for anionic drug elimination in patients with mesangial proliferative glomerulonephritis.	Pharm. Res.	22(12)	2016-2022	2005
Niida et al.	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
Irie et al.	Prediction of glycylsarcosine transport in Caco-2 cell lines expressing PEPT1 at different levels.	Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.	452(1)	64-70	2006
Asaka et al.	Androgen receptor is responsible for	Pharm. Res.	23(4)	697-	2006

	rat organic cation transporter 2 (rOCT2) gene regulation but not for rOCT1 and rOCT3.			704	
Shimakura et al.	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
Tsuda et al.	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
Noshiro et al.	The PDZ domain protein PDZK1 interacts with human peptide transporter PEPT2 and enhances its transport activity.	Kidney Int.	70(2)	275-282	2006
Masuda et al.	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
Terada et al.	Molecular cloning, functional characterization and tissue distribution of rat H ⁺ /organic cation antiporter MATE1.	Pharm. Res.	23(8)	1696-1701	2006
Ogasawara et al.	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
Okuda et al.	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
Shimakura et al.	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
Yonezawa et al.	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
Terada and Inui	Gene expression and regulation of drug transporters in the intestine and kidney.	Biochem. Pharmacol.	73(3)	440-449	2007
Tsuda et al.	Oppositely directed H ⁺ gradient functions as a driving force of rat	Am. J. Physiol. Renal Physiol.	292(2)	F593-F598	2007

	H ⁺ /organic cation antiporter.				
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 glucuronide via human organic anion transporters hOAT1 and hOAT3.	Biochem. Pharmacol.	74(1)	161-168	2007
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	Am. J. Physiol.	293(5)	F1564-	2007

	of human and rat H ⁺ /organic cation antiporters (MATE1).	Renal Physiol.		F1570	
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		

II-C-1: ペプチドトランスポーターPEPTs

II-C-1-1. はじめに

非エステル型の経口用 β -ラクタム抗生物質は、低脂溶性であり、生理的 pH においてイオン化している。それにも関わらず良好な腸管吸収を示すことから、腸管吸収に特殊輸送系の関与していることが 1970 年代後半より示唆されていた。その後、薬物輸送研究に膜小胞系が導入されたことによって、詳細な輸送機構解析が可能となり、1986 年筆者の属する研究室よりはじめて、種々経口用アミノ β -ラクタム抗生物質がペプチドトランスポーターを介して輸送されることが実証された¹⁾。さらに、抗がん剤ベスタチンや、一部のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬など小分子ペプチドと構造的に類似した薬物が、ペプチドトランスポーターを介して輸送されることが報告され、ペプチドトランスポーターは様々な薬物の腸管吸収を媒介していることが明らかになった。

ペプチドトランスポーターの分子実体は、1994 年、Hediger 並びに Leibach らのグループによるウサギ小腸 RNA を用いた発現クローニングによって同定され、PEPT1 と名付けられた²⁾。現在 PEPT1 は、Human Genome Organization による SLC 分類では、SLC15A1 となる。ついで PEPT1 のホモログとして、腎 cDNA ライブラリーよりヒト PEPT2 (SLC15A2) が単離された³⁾。われわれは、ラット腎 cDNA ライブラリーから PEPT1 及び PEPT2 の cDNA をクローニングし^{4,5)}、両者の特性について比較解析を行ってきた (図 1)^{6,7)}。両トランスポーターは約 50% のアミノ酸ホモロジーを示す推定 12 回膜貫通型タンパクであり、PEPT1 は低親和性型、PEPT2 は高親和性型のトランスポーターとして機能している。臓器分布としては、PEPT1 が小腸>腎臓に発現しているのに対して、PEPT2 は腎臓>>脳・肺・乳腺・脾臓など多くの臓器に発現している。ヒト消化管における PEPT1 の発現分布について精査したところ、PEPT1 は十二指腸>空腸>回腸の順に発現していること、また腸上皮化生に伴い胃にも発現していることが示されている⁸⁾。従来、ペプチドトランスポーターの機能はペプチド吸収という観点から、主に小腸や腎臓で解析が行われてきたが、遺伝子クローニング以降、小腸や腎臓以外での臓器における局在や機能解析に関する報告がなされ^{9,10)}、ペプチドトランスポーターの新たな生理機能や薬物動態学的役割が明らかにされつつある。

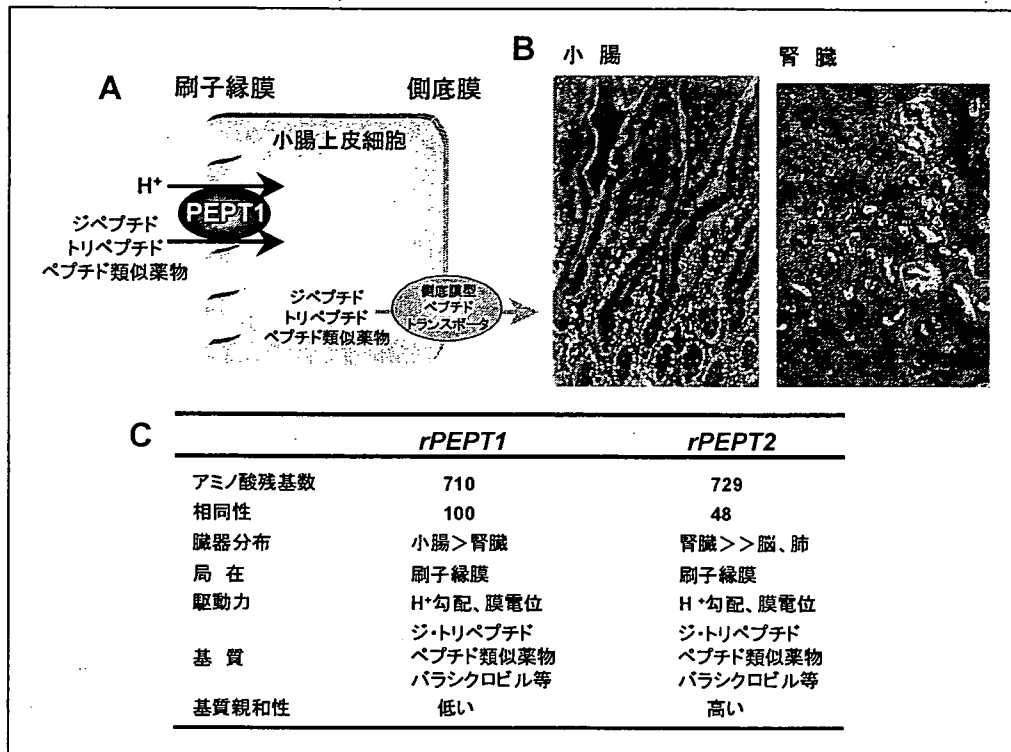


図 1. ペプチドトランスポーターの特徴

- A. 小腸上皮細胞におけるペプチドトランスポーターの役割. 小腸上皮細胞の刷子縁膜には PEPT1 が、また側底膜には側底膜型ペプチドトランスポーター (分子実体は未同定) が発現し、ジペプチドやトリペプチド並びにペプチド類似薬物の経上皮輸送を媒介している。
- B. 小腸及び腎尿細管上皮細胞における PEPT1 の免疫組織染色. PEPT1 は小腸及び腎尿細管上皮細胞の刷子縁膜に局在している。
- C. ラット PEPT1 及び PEPT2 の比較. 両トランスポーターの局在、駆動力、基質認識特性は類似しているが、臓器分布並びに基質親和性が異なる。

II-C-1-2. PEPT1 の基質特異性と薬物送達への応用

ペプチドトランスポーターの生理的基質であるジペプチドおよびトリペプチドは、遊離のアミノ基とカルボキシル基、並びにペプチド結合を有することから、当初、これらの構造がペプチドトランスポーターに認識・輸送されるための必要十分条件であると考えられていた。しかし基質特異性に関する研究が進展し、これらの条件を充たさない化合物でも、ペプチドトランスポーターの基質になることが明らかになり、その条件は以前考えられていたほど単純ではないことが判明した。顕著な例としては、最も重要な構造であると考えられていたペプチド結合を持たなくとも、基質になりうる化合物 (valacyclovir など) が挙げられる。

Valacyclovir (商品名 VALTREX) は抗ウイルス薬 acyclovir の経口吸収性を改善したプロドラッグであり、acyclovir にアミノ酸のバリンをエステル結合させた構造を有している。修飾するバリンの L 体と D 体の間で acyclovir の尿中回収率が異なったことから、開発当初から valacyclovir の

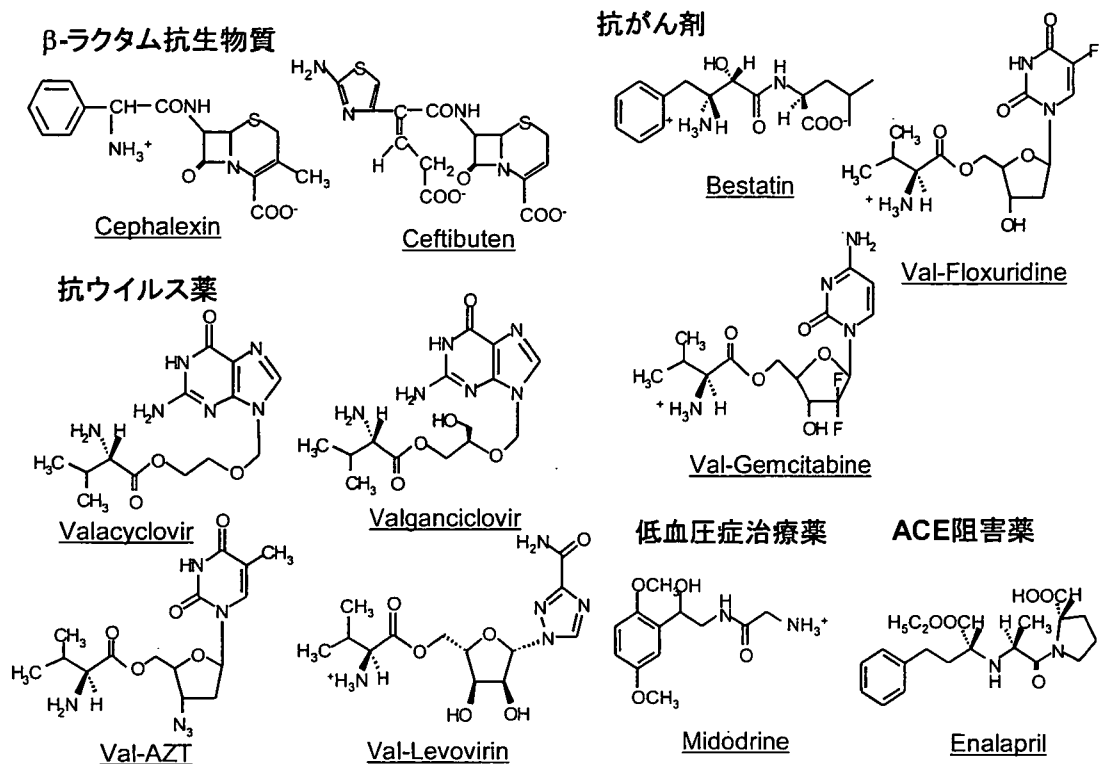


図 2. PEPT1 によって輸送される薬物

古典的には経口用 β-ラクタム抗生物質、抗がん剤 bestatin、ACE 阻害薬などが知られているが、最近では低血圧症治療薬 midodrine や、抗ウイルス薬や抗がん剤のバリンエステル誘導体が、PEPT1 の基質になることが報告されている。

吸収には何らかのトランスポーターが関与していると考えられていた。その後、Amidon らのグループによって、valacyclovir が PEPT1 によって輸送されることが明らかにされ、バリンによるエステル修飾が難吸収性薬物の吸収改善に有効であることが示された¹¹⁾。現在、バリンのエステル結合により PEPT1 の基質になることが報告されている薬物としては、抗ウイルス薬 zidovudine (AZT)、ganciclovir (バリン誘導体: valganciclovir (商品名 VALIXA))、levovirin、抗がん薬 floxiuridine などが挙げられる (図 2)。

また難吸収性薬物をアミノ酸とのペプチド結合によりペプチド様薬物とし PEPT1 の基質に変換することは、古くからのアイデアとして提唱されていた¹²⁾が、実際医薬品の開発に応用された例はなかった。我々は最近、低血圧症治療薬 midodrine (図 2, 商品名 METLIGINE) が PEPT1 の基質になることを見出した¹³⁾。すなわち、midodrine は活性本体である 1-(2', 5'-dimethoxyphenyl)-2-aminoethanol (DMAE) をグリシンとペプチド結合させたプロドラッグであり、プロドラッグ化により、バイオアベイラビリティが約 50% から 100% に改善されることが知られている。DMAE の種々アミノ酸誘導体を合成し、PEPT1 との親和性や *in vivo* における安定性を検討したところ、修飾するアミノ酸はグリシンが適していることが明らかになった。後付けではあるが、midodrine

は PEPT1 の機能特性をうまく利用して開発された医薬品といえよう。今後、注射薬として開発された低分子医薬品の経口薬への変換や、難吸収性が開発上問題となっている低分子化合物については、上述したアミノ酸修飾により PEPT1 の基質に変換するという吸収改善 strategy が、医薬品開発の一つの選択肢として有効であろう。

II-C-1-3. PEPTs の構造・機能相関とシミュレーション

ペプチドトランスポーターの遺伝子クローニングによって、輸送の分子機序に関する研究が可能になり、散発的ではあるが部位特異的変異導入法や PEPT1/PEPT2 のキメラ構築によって、ペプチドトランスポーターの構造・機能相関に関する情報が集積しつつある。これまで、 H^+ 勾配と共役する様々なトランスポーターにおいて、ヒスチジン残基が機能的に重要な役割を果たしていることが示唆されてきたが、PEPT1 においても、第 2 及び第 4 番目の推定膜貫通領域に存在するヒスチジン残基が、 H^+ 結合部位並びに基質結合部位として機能していることが示唆されている^{14,16)}。その他現在得られている情報としては、第 2, 5, 7 及び 10 番目の推定膜貫通領域に存在するチロシン残基などが、輸送活性に重要な役割を果たしていることが報告されている。また、キメラ構築に基づく解析から、N 末端領域に基質結合部位の存在することが示唆されている¹⁷⁾。しかしこれらの情報を統合しても、ペプチドトランスポーターがどのように基質を認識し、輸送しているかはほとんど解明されていない。

そこでこれらの手法とはまったく異なるアプローチとして、数理的モデルとコンピュータシミュレーションを活用し、PEPT1 の輸送機序解明を試みた¹⁸⁾。詳細は割愛するが、PEPT1 の基質である glycylsarcosine (両性イオン) と ceftibuten (アニオン) の各 pH における詳細な速度論解析と文献情報に基づき、 H^+ は H^+ 結合部位だけでなく基質認識部位にも結合し、基質の結合に影響を及ぼすと仮説を立てた (図 3)。推測したメカニズムから 14 状態モデルを導き、コンピュータシミュレーションによって PEPT1 の機能を再現したところ、glycylsarcosine 輸送の濃度依存性や pH 依存性、膜電位依存性を精度良く再現できることが判明した。さらに、ceftibuten や midodrine (カチオン) 並びにチャージを有するジペプチドの輸送も予測できたことから、推測したメカニズムの妥当性が示唆された。

ペプチドトランスポーターの広範な基質認識特性がいかんして担保されているかは、古くて新しい課題であるが、最近では有機化学の研究者らも様々な化合物の合成を通して、この問題にチャレンジしている¹⁹⁾。また、大腸菌における種々トランスポーターの結晶化とそれに引き続く構造解析を応用して、薬物トランスポーターの立体構造解析も可能な時代になりつつある²⁰⁾。今後はこれら異分野における様々なコンセプトや技術を積極的に取り込んで、ペプチドトランスポーターの輸送機序、基質認識特性に関する研究が学際的に発展することが期待される。

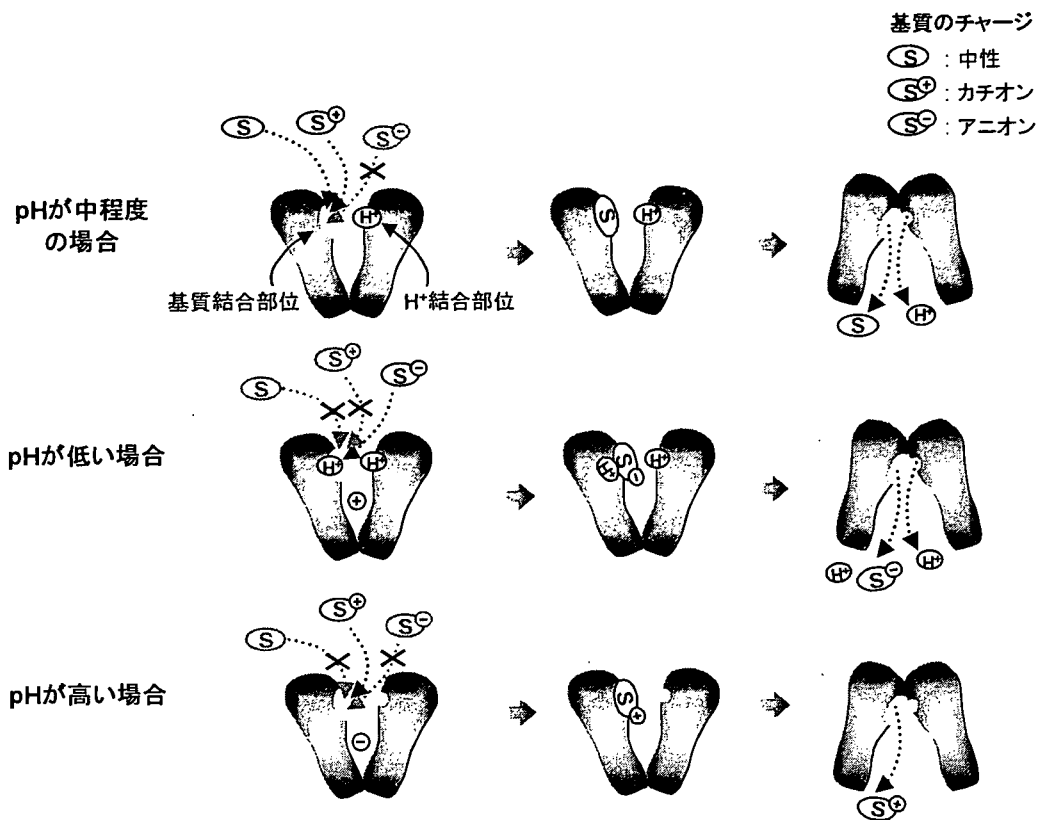


図3. PEPT1による荷電状態の異なる基質とH⁺共輸送の推定メカニズム

PEPT1は、基質結合部位とH⁺結合部位を1つずつ有し、pHが低い場合は、H⁺がH⁺結合部位だけでなく基質認識部位にも結合しうる。一方、基質の結合パターンはチャージによって異なり、中性のものはH⁺化された基質認識部位へは結合できない。対称的に、負の電荷を帯びた基質は、H⁺化された基質認識部位にのみ結合でき、2つのH⁺と共輸送される。また正の電荷を帯びた基質は、H⁺結合部位にH⁺が結合していても、基質結合部位へ結合できる。これらの推定メカニズムを、コンピューターシミュレーションによって検証したところ、これまで報告されているPEPT1の機能を精度良く再現することができた¹⁸⁾。

II-C-1-4: ペプチドトランスポーターの調節機構

小腸PEPT1の活性や発現は、食餌、ホルモン、発育、日周リズムあるいは、ある種の薬物処理など様々な条件によって調節されることが報告されている²¹⁾。例えば、ラット小腸PEPT1の発現や輸送活性には、暗期に高く明期に低い日内リズムが存在し、この日内リズムに応じて、経口用β-ラクタム抗生物質の体内動態が変動すること、また、摂食条件によってPEPT1日内リズムの変動することが知られている²²⁻²⁴⁾。上述した調節の多くは、PEPT1 mRNAの発現が変化することによって起こることが示されているが、PEPT1の転写制御機構については情報が乏しかった。そこで我々は、ヒトPEPT1のプロモーター解析を行い、基礎的あるいは臓器特異的な発現に関与する転写因子の同定を試みた。

PEPT1プロモーター領域のdeletion analysisの結果、転写開始部位の上流35から172 bp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、