

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（トキシコゲノミクス分野）

薬物の毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の推定と毒性回避を
指向したスクリーニング系の開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉山 雄一

平成20（2008）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 薬物の毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の推定と毒性回避を指向したスクリーニング系の開発 1
杉山雄一

II. 分担研究報告

1. 薬物の効果・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の *in vitro* 実験系からの推定と、毒性回避のための *in vitro* スクリーニング系の開発 8
杉山雄一
2. 薬効・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の推定のための臨床研究 15
家入一郎
3. 薬剤代謝・トランスポーター遺伝子の SNP 解析キットの開発 18
徳永勝士

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷 25

厚生科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業（トキシコゲノミクス研究））

総括研究報告書

薬物の毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の推定と毒性回避を指向したスクリーニング系の開発

主任研究者 杉山雄一・東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室・教授

研究要旨 本年度は、薬物の毒性を決める一要因である薬物動態・臓器分布を決定付ける要因となりうる代謝酵素・トランスポーターの重要性を明らかに出来る方法論を構築し、多数の薬物を用いて、以下のような事例解析を行った。(1) ヒト肝細胞に発現する取り込み・排泄トランスポーターが肝臓への分布に与える影響の解析, (2) 腎臓に発現する有機アニオンの取込みに関与する OAT (organic anion transporter) 1, OAT3 のヒトにおけるプローブ薬・プローブ阻害剤の開発, (3) phytoestrogen の体内分布における BCRP(breast cancer resistance protein)の重要性の解析, (4) エピジェネティクスと転写因子の interplay に基づくトランスポーターの発現制御メカニズムの解析。さらに、遺伝子多型解析を通じて、ヒトにおけるそれら分子の機能と薬物動態との関連を明らかにするために、sulfasalazine の血中濃度を与える ABCC2 および NAT2 の遺伝子多型の影響に関する臨床研究を行ない、多型との関連性を見出した。さらに、それらを簡便に検査できる系として、digitag2 法を開発し、実際のヒト臨床サンプルを用いて、高確率で正確に薬物代謝酵素・トランスポーターの遺伝子多型診断が出来ることが示された。

分担研究者

家入一郎（九州大学大学院薬学研究院・准教授）
徳永勝士（東京大学大学院医学系研究科・教授）

A.研究目的

薬物の効果の個人差や副作用を引き起こすヒトの遺伝的要因について、遺伝子ノックアウト動物や遺伝子発現細胞などを用いて、特定の薬物動態・薬効・副作用に関係する分子が毒性に与える影響を定量的に観察することで、毒性関連候補遺伝子を推測する。上記実験の結果に基づき、遺伝子多型との関連を探る臨床研究を行い、さらに候補 SNPs を迅速に診断できるチップの開発を行うことで、臨床医療に成果を還元できるように検証実験を行う。

B.研究方法

(1) ヒト肝細胞に発現する取り込み・排泄トランスポーターが肝臓への分布に与える影響の解析

ヒト肝臓における取り込み・排泄トランスポーターの解析を行うために、*in vitro* 実験系では、ヒト凍結肝細胞・トランスポーター単独発現細胞、トランスポーター共発現細胞、トランスポーター発現膜ベシクル、サンドイッチ培養肝細胞を用い、*in vivo* ではトランスポーターノックアウトマウスを用いた薬物動態解析を行った。

(2) 腎臓に発現する有機アニオンの取込みに関与する OAT (organic anion transporter) 1, OAT3 のヒトにおけるプローブ薬・プローブ阻害剤の開発

ヒト腎臓の取り込みトランスポーターをフェノタイピング可能な薬物を探索するために、ヒト腎スライスおよび遺伝子発現細胞を用いた *in vitro* 解析、ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 解析ならびに健常人を対象とした薬物間相互作用試験としてヒト臨床研究を行った。

(3) phytoestrogen の体内分布における BCRP(breast cancer resistance protein)の重要性の解析

genistein, coumestrol, daidzein について、

Bcrp, Mdr1a 発現細胞における経細胞輸送を観察するとともに、Bcrp ノックアウトマウスを用いた体内動態解析を行った。あわせて、Bcrp の精巣や精子における局在を免疫染色法により検討した。

(4) エピジェネティクスと転写因子のinterplayに基づくトランスポーターの発現制御メカニズムの解析

OAT1, URAT1 (urate transporter)の転写上流域をクローニングし、luciferase assay 法を用いて、転写因子の結合に重要な領域を絞り込んだ。さらに、一般の発現・非発現部位におけるトランスポーター遺伝子のメチル化の度合いを調べるために、Bisulfite sequencing 法を用いて比較した。

(5) sulfasalazine の血中濃度に与える ABCG2 および NAT2 の遺伝子多型の影響に関する臨床研究

ABCG2 (421C>A)ならびに NAT2 (*4, *5B, *6A, *7B)遺伝子型が既知の健常成人 37 名を対象として、sulfasalazine 経口投与後の体内動態試験を行った。

(6) DigiTag2 法による薬剤代謝・トランスポーター遺伝子の SNP 解析キットの確立

昨年度までに開発されてきた DigiTag2 法を用いて、既知および新規の薬剤応答性遺伝子群の機能的 SNP 45 種類を同時並列的に検査することをヒトサンプルを用いて実際に試みた。

(倫理面への配慮)

(1)については、ヒト肝細胞は、あらかじめ販売元の方で、informed consent が書面にて得られたヒトから単離された肝細胞を、一般試薬業者より購入して用いた。(2)について、ヒト腎臓を用いた研究については、東京女子医科大学の協力により、東京女子医科大学及び東京大学薬学部の倫理委員会の承認の元、あらかじめ informed consent が書面にて得られた患者から摘出した腎病変部のうち正常部分のみを用いることで実験を行っている。ヒト臨床試験については、北里大学東病院臨床治験センターの協力により、あらかじめ北里大学東病院ならびに東京大学薬学部の倫理委員会の承認を得た上で行った。(5)については、遺伝子解析に

使用した DNA は連結不可能匿名化された試料であり、本研究の目的等、倫理指針に準拠した説明を行い、書面による承諾を得た後に使用した。さらに、総ての研究は、関連研究機関総てのゲノム倫理審査委員会で、審査・承認を受けた後実施した。臨床試験は、臨床試験を専門とする医療機関において実施した。(6)については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会より承認を得た疾患関連遺伝子多型解析研究に含まれる。また、本研究は技術開発研究であり、技術の評価に用いるヒトゲノム試料は、すべて公的財団（ヒューマンサイエンス振興財団）より得た連結不可能匿名化済みの試料（PSC 細胞株の精製 DNA サンプル）である。

C.研究結果

(1) ヒト肝細胞に発現する取り込み・排泄トランスポーターが肝臓への分布に与える影響の解析

bosentan の肝取り込み機構について調べたところ、OATP1B1, OATP1B3 が同程度寄与していることを発現系ならびにヒト肝細胞を用いた解析から明らかにした。また fexofenadine に関しては、ヒト OATP1B3/BSEP, OATP1B3/MRP2 共発現細胞を用いた経細胞輸送の解析から、BSEP, MRP2 の基質になることが明らかとなった。一方、Mrp2 ノックアウトマウスでは、胆汁排泄はあまり変動しなかったことから寄与がマイナーであると考えられた。一方、血管側の排泄トランスポーターMrp3 のノックアウトマウスで、肝クリアランスの減少が見られ、fexofenadine の体内動態に、Mrp3 が関与していることを示した。

また、telmisartan の主代謝物である telmisartan glucuronide (tel-glu)の胆汁排泄トランスポーターを明らかにするために、新たに OATP1B3/MRP2, OATP1B3/MDR1, OATP1B3/BCRP の共発現細胞を構築し、tel-glu の経細胞輸送を評価した結果、MDR1, MRP2, BCRP 全ての基質となることが明らかとなった。

また、sandwich 培養肝細胞の実験系を確立し、in vitro 実験から得られたデータをもと

に *in vivo* における胆汁排泄クリアランスを予測したところ、大体 *in vitro* からの予測値が、*in vivo* の実測のクリアランスと比較して、1/10 程度で良好に相関することが明らかとなった。さらに、胆汁排泄トランスポーターの相対的な寄与率を評価するために、MDR1, MRP2, BCRP それぞれの選択的阻害剤を探索し、それらを用いることで、3 種類の HMG-CoA 還元酵素阻害薬の胆汁排泄に関わるトランスポーターの寄与率が異なることを明らかにした。

(2) 腎臓に発現する有機アニオンの取込みに関与する OAT1, OAT3 のヒトにおけるプローブ薬・プローブ阻害剤の開発

OAT1, OAT3 の臨床にてヒトに投与する選択的基質(プローブ薬)の候補として、*adefovir*, *benzylpenicillin* (PCG) を選択し、OAT1 の選択的阻害剤として *p-aminohippurate* (PAH)、OAT1, OAT3 の両方の阻害剤として、*probenecid* が *in vitro* 実験および *in vivo* ノックアウト動物実験から見出された。さらに、ヒト臨床試験において、健常人男性を6名ずつ4群にわけ、各群に、*adefovir*+PAH, *adefovir*+*probenecid*, PCG+PAH, PCG+*probenecid* を、阻害剤の濃度を4期に分けて徐々に上昇させていくことで、基質薬物に対する影響を観察した。その結果、*adefovir* は、PAH, *probenecid* 双方の同時投与により、投与量依存的な血中濃度の上昇が観察されたが、予想と反して、PCG+PAH の投与により、PAH の投与量を上げると、PCG の血中濃度が下がるという現象が見られた。

(3) phytoestrogen の体内分布における BCRP の重要性の解析

In vitro 実験の結果、*Genisterin*, *daidzein*, *coumestrol* は *Bcrp* の良好な基質であり、*Bcrp* ノックアウトマウスにおいて、*genistein*, *daidzein* の血中濃度の上昇が見られた一方、3化合物とも、脳や精巣への移行は野生型マウスと比較して有意な上昇が見られた。

(4) エピジェネティクスと転写因子の interplay に基づくトランスポーターの発現制御メカニズムの解析

Human および mouse OAT1 遺伝子の上流配列を用いて *luciferase assay* を行なったと

ころ、HNF1 サイトが転写の維持に必要であることがわかった。さらに、その部位に HNF1 α のホモダイマーもしくは、HNF1 α / β のヘテロダイマーの直接的な結合が *gel-shift assay* により明らかとなった。一方、human URAT1 遺伝子についても、HNF1 α /HNF1 β による正の発現制御がかかっていることを明らかにし、さらに上流域の DNA メチル化状態を、*bisulfite sequencing* 法を用いて検討したところ、非発現部位において human URAT1 遺伝子は高メチル化状態にあったが、発現部位である腎臓の皮質では、低メチル化状態にあった。

(5) *sulfasalazine* の血中濃度に与える ABCG2 および NAT2 の遺伝子多型の影響に関する臨床研究

ABCG2-421C/C (n = 12) 、 C/A (n = 16) 、 A/A (n = 9) 群における SASP の AUC₀₋₄₈ の平均値 (\pm S.D.) はそれぞれ 171 ± 85 、 330 ± 194 、 $592 \pm 275 \mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{ml}^{-1}$ で、各群間において有意な差が認められ、ABCG2-421A allele を持つ被験者において有意に増大した。また、分解物 SP 及びそのアセチル体 AcSP の体内動態に関して、AUC_{AcSP}/AUC_{SP} は NAT2-RA, IA, SA 各群間に有意な差が認められ、従来通り NAT2 遺伝子型によって層別化された。

(6) Digitag2 法による薬剤代謝・トランスポーター遺伝子の SNP 解析キットの確立

日本人健常者 192 検体を用いて 45-plex SNP タイピングを行った結果、39 種類の SNP でタイピングが可能であることが明らかとなった。解析対象とした全 18 遺伝子(薬剤トランスポーター4 遺伝子、薬剤代謝酵素 14 遺伝子)のうち、薬剤トランスポーターの 3 遺伝子と薬剤代謝酵素の 10 遺伝子は今回用意したタイピングキットで解析できることが明らかとなった。

D. 考察

薬物の毒性発現において重要な因子の 1 つに、毒性発現部位への薬物の集積が挙げられる。それを担う分子として、数多くの取り込み・排泄トランスポーター群が重要であると考えられる。肝臓においても取り込み・排泄トランスポーターの機能により、

肝臓内への薬物の集積や、胆汁中への排泄効率が決定される。従って、これらの評価系の確立は、薬剤の肝毒性などを考える上でも重要であると考えられる。本研究では、新たにトランスポーター共発現細胞を構築して、取り込み・排泄トランスポーターを同時に決定する系を構築するとともに、サンドイッチ培養肝細胞を用いることで、*intact* な肝細胞における胆汁排泄トランスポーターの機能を見ることができ、選択的阻害剤により、寄与率を推定できる系を立てることが出来た。今後、創薬スクリーニングに有用な系となることが期待される。また、腎臓において、ヒト OAT1, OAT3 の機能をフェノタイピングする手段を一部確立した。臨床において、各代謝酵素についてはフェノタイピング手法が確立しているが、一方で、トランスポーターについてはこのような試みはなされておらず、ヒト *in vivo* で個々のトランスポーター機能を決定付けることが出来る新しいトランスポーター機能評価法として、更なる検討とともに確立が望まれる。また、BCRP が脳や精巣への薬物の移行に関与しうる可能性が示され、神経毒性や生殖毒性を引き起こす薬物や状況を決定付ける要因として、BCRP の機能が新たに付け加えることができた。また、これら組織に発現するトランスポーターの発現制御の新たなメカニズムとして、DNA メチル化による制御を加えることができ、今後、動的な発現制御への関与など新たな調節機構として注目を集めると思われる。一方、遺伝子多型との関連においては、sulfasalazine の体内動態に、BCRP ならびに NAT2 の両方の機能変動が影響を与えることを示し、代謝酵素とトランスポーターの体内動態における *interplay* が明らかとなるとともに、sulfasalazine が、今後 BCRP 機能を評価するためのヒトプローブ薬として利用しうる可能性が示唆された。また、このような SNPs を迅速に評価する系として、独自開発した DigiTag2 法は、高価な自動装置を用いないで数十種から数百種の SNP を同時並列タイピングできるという大きな利点を持つ方法を開発し、ヒトサンプルにおいて重要なトランスポーターや薬物

代謝酵素の遺伝子多型を同定するに至った。今回うまくいかなかったものについても条件検討を重ねる上で、問題を克服できると考えており、今後、臨床への応用が期待される。

E. 結論

肝臓における取り込み・排泄メカニズムを明らかにするための実験系として、OATP1B3 を取り込み側に持つダブルトランスフェクタントや、sandwich 培養肝細胞実験系と選択的阻害剤を用いた寄与率評価系を構築した。腎臓については、OAT1, OAT3 のプローブ薬物の候補を選択し、臨床試験を通じて、一部使用可能なものを見出すことに成功した。また、BCRP が精巣や脳への phytoestrogen の移行に関与することを示し、神経・精巣毒性を決める新たな要因としての BCRP の可能性を示した。また、これらトランスポーターの制御メカニズムとして、転写因子と DNA メチル化の両方の協調的な関与が重要であることを見出した。これらの知見は、薬物の組織集積のメカニズム解明とその制御に対していずれも有用な情報を与えているといえる。さらに、BCRP が基質薬物の消化管吸収に重要な役割を果たしており、その遺伝子型が基質薬物の体内動態に見る個人差の原因となることが明らかとなった。

DigiTag2 法を用いて、ヒト代謝酵素・トランスポーターの重要な遺伝子多型を簡便に概ね評価できる系の構築に成功した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Aoki K, Nakajima M, Hoshi Y, Saso N, Kato S, Sugiyama Y and Sato H. Effect of aminoguanidine on lipopolysaccharide-induced changes in rat liver transporters and transcription factors. *Biol Pharm Bull*, 31(3),

- 412-420 (2008)
- (2) Ishiguro N, Maeda K, Saito A, Kishimoto W, Matsushima S, Ebner T, Roth W, Igarashi T and Sugiyama Y. Establishment of a set of double transfectants coexpressing organic anion transporting polypeptide 1B3 and hepatic efflux transporters for the characterization of the hepatobiliary transport of telmisartan acylglucuronide. *Drug Metab Dispos*, 36(4), 796-805 (2008)
- (3) Matsushima S, Maeda K, Hayashi H, Debori Y, Schinkel AH, Schuetz JD, Kusuhara H and Sugiyama Y. Involvement of multiple efflux transporters in hepatic disposition of fexofenadine. *Mol Pharmacol*, in press (2008)
- (4) Saji T, Kikuchi R, Kusuhara H, Kim I, Gonzalez FJ and Sugiyama Y. Transcriptional regulation of human and mouse organic anion transporter 1 by hepatocyte nuclear factor 1 alpha/beta. *J Pharmacol Exp Ther*, 324(2), 784-790 (2007)
- (5) Enokizono J, Kusuhara H and Sugiyama Y. Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens. *Mol Pharmacol*, 72(4), 967-975 (2007)
- (6) Kikuchi R, Kusuhara H, Hattori N, Kim I, Shiota K, Gonzalez FJ, Sugiyama Y. Regulation of tissue-specific expression of the human and mouse urate transporter 1 gene by hepatocyte nuclear factor 1 alpha/beta and DNA methylation. *Mol Pharmacol*, 72(6), 1619-1625 (2007)
- (7) Yamasaki Y, Ieiri I, Kusuhara H, Sasaki T, Kimura M, Tabuchi H, Ando Y, Irie S, Ware J, Nakai Y, Higuchi S, Sugiyama Y. Pharmacogenetic Characterization of Sulfasalazine Disposition Based on NAT2 and ABCG2 (BCRP) Gene Polymorphisms in Humans. *Clin Pharmacol Ther.*, in press (2008)
- (8) Ieiri I, Suwannakul S, Maeda K, Uchimaru H, Hashimoto K, Kimura M, Fujino H, Hirano M, Kusuhara H, Irie S, Higuchi S, Sugiyama Y. SLCO1B1 (OATP1B1, an uptake transporter) and ABCG2 (BCRP, an efflux transporter) variant alleles and pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 82(5), 541-7 (2007)
- (9) Takane H, Miyata M, Burioka N, Kurai J, Fukuoka Y, Suyama H, Shigeoka Y, Otsubo K, Ieiri I and Shimizu E. Severe toxicities after irinotecan-based chemotherapy in a patient with lung cancer: a homozygote for the SLCO1B1*15 allele. *Ther Drug Monit*, 29(5), 666-668 (2007)
- (10) 西田奈央、徳永勝士：大規模 SNP タイピングによる多因子疾患遺伝子の探索。「ゲノム情報と生命現象の統合的理解 2007」 榊 佳之、伊藤隆司、辻 省次、小原雄治（編）、実験医学増刊 羊土社 25：178-184, 2007.
2. 学会発表
- (1) 平松万里子、前田和哉、竹澤俊明、Bi Y-A、Brouwer KR、杉山雄一 サンドイッチ培養肝細胞を用いた薬物の胆汁排泄過程におけるトランスポーターの寄与の検討 日本薬剤学会第22年会、2007.5、埼玉
- (2) 佐治孝実、菊地良太、楠原洋之、Kim I, Gonzalez FJ、杉山雄一 Hepatocyte Nuclear Factor 1a/b によるヒト及びマウス Organic

- Anion Transporter 1 の発現制御 日本薬剤学会第22年会、2007.5、埼玉
- (3) 久保和也、前田和哉、杉山雄一 エンドセリン受容体阻害薬ボセンタンの肝臓への取り込みに対する OATP ファミリートランスポーターの関与 第15回肝病態生理研究会、2007.5、東京
- (4) 前田和哉、松島総一郎、楠原洋之、杉山雄一 抗ヒスタミン薬 Fexofenadine の肝輸送に關与するトランスポーターの同定 第15回肝病態生理研究会、2007.5、東京
- (5) Matsushima S, Maeda K, Hayashi H, Debori Y, Schinkel AH, Adachi M, Schuetz JD, Kusuhara H and Sugiyama Y. Role of various efflux transporters in the pharmacokinetics of fexofenadine in the liver. 4th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery (WCDATD), 2007.6, Kanazawa
- (6) Sugiyama Y. Predicting drug disposition and response in individual patients. 6th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, 2007.6, Budapest, Hungary
- (7) Sugiyama Y. Strategies to drug discovery and drug development in pharmaceutical sciences. 6th Symposium New Developments in Clinical Pharmacy and Clinical Pharmacology, 2007.6, Munich, Germany.
- (8) Sugiyama Y. Integration of in vitro and in vivo data of DDI and GPs based on PBPK modeling. BioMedical Transporter 2007, 2007.8, Bern, Switzerland.
- (9) Maeda K, Hiramatsu M, Bi Y-A, Takezawa T and Sugiyama Y. Analysis of the contribution of efflux transporters to the biliary excretion of drugs using B-CLEAR[®] (sandwich-cultured rat hepatocytes). 6th World congress on Alternatives & Animals Use in the life sciences, 2007.8, Tokyo
- (10) Enokizono J, Kusuhara H and Sugiyama Y. Cooperative detoxification of xenobiotic compounds by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and sulfotransferases. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai
- (11) Ichihara S, Kikuchi R, Maeda K and Sugiyama Y. Transcriptional regulation of human organic anion transporting polypeptide 1B3 in cancer. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai
- (12) Ose A, Kusuhara H, Tohyama K, Kitamura S and Sugiyama Y. The role of mouse Oatp1a4 in the uptake and efflux of organic anions across the blood-brain barrier. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai
- (13) Saji T, Kikuchi R, Kusuhara H, Kim I, Gonzalez FJ and Sugiyama Y. Transcriptional regulation of human and mouse organic anion transporter 1 by hepatocyte nuclear factor 1a/b. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai
- (14) Watanabe T, Maeda K, Kusuhara H and Sugiyama Y. Prediction of the hepatic and renal clearance of transporter substrates from in vitro uptake assays. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai
- (15) Saito A, Ishiguro N, Maeda K, Kishimoto W, Ebner T, Roth W, Igarashi T and Sugiyama Y. Characterization of the transcellular transport properties of OATP1B3 substrates in new versions of double transfected MDCKII cells, OATP1B3/MDR1, OATP1B3/MRP2 and OATP1B3/BCRP. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai

(16) Kishimoto W, Ishiguro N, Maeda K, Saito A, Ebner T, Roth W, Igarashi T and Sugiyama Y. OATP1B3 is the predominant transporter isoform responsible for the hepatic uptake of the acylglucuronide of the angiotensin II receptor antagonist, telmisartan. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai

(17) Kikuchi R, Kusuhara H, Shiota K and Sugiyama Y. Ontogenic regulation of organic anion transporters in mouse kidney. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai

(18) Maeda K, Matsushima S, Hayashi H, Debori Y, Schinkel AH, Adachi M, Schuetz JD, Kusuhara H and Sugiyama Y. Involvement of multiple transporters in the efflux of fexofenadine in liver. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai

(19) Sugiyama Y. PBPK Modeling for Transporter-mediated Drug Disposition in the Body: Prediction from In Vitro to In Vivo and from Animal to Human. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai

(20) Sugiyama Y. Transporter-based Drug Interactions: When Have We Been Are We going? AAPS Workshop on Enzyme and Transporter Based Drug Interactions, 2007.11, San Diego, USA.

(21) 渡辺友子、前田和哉、楠原洋之、杉山雄一 in vitro 実験の取り込みクリアランスに基づく薬物トランスポーター基質の肝腎クリアランスの予測 第29回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2007.11、仙台

(22) Sugiyama Y. The role of influx and efflux transporters in drug disposition. Joint Meeting of the Southeast Asian Western Pacific Regional Federation of Pharmacologists and

the Australasian Society of Clinical and Experimental Pharmacologists and Toxicologists, 2007.12, Adelaide, Australia.

(23) Yamasaki Y, Ieiri I, Kusuhara H, Sasaki T, Kimura M, Tabuchi H, Maeda K, Hirota T, Ando Y, Irie S, Ware JA, Sugiyama Y and Higuchi S. Pharmacogenetic Characterization of Sulfasalazine Disposition Based on NAT2 and ABCG2 (BCRP) Gene Polymorphisms in Humans. 8th International ISSX Meeting, 2007 10, Sendai

(24) Nishida N, Tanabe T, Takasu M, Suyama A, Tokunaga K. Multiplex SNP typing method: DigiTag2. The American Society of Human Genetics 57th Annual Meeting (P.504), 2007.10, San Diego, California

(25) 西田奈央、田邊哲也、高須美和、陶山明、徳永勝士 DigiTag2 法によるマルチプレックス SNP タイピング, 第30回日本分子生物学会年会(P.703)、2007.12、横浜

(26) 西田奈央、田邊哲也、高須美和、陶山明、徳永勝士 マルチプレックス SNP タイピング法 : DigiTag2、日本人類遺伝学会第52回大会 (P.128)、2007.9、東京

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

厚生科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業（トキシコゲノミクス研究））

分担研究報告書

薬物の効果・毒性発現を決める薬物動態・効果制御分子の *in vitro* 実験系からの推定と、毒性回避のための *in vitro* スクリーニング系の開発

分担研究者 杉山雄一・東京大学薬学系研究科分子薬物動態学教室・教授

研究要旨 薬物の毒性発現の決定要因としての臓器集積性を決めるトランスポーターについて多角的なアプローチで検討を行い、重要性を明らかにした。肝臓においては、取り込み・排泄に関与するトランスポーターを簡便に決定する方法として、取り込み・排泄トランスポーターを同時発現させたダブルトランスフェクタントの構築や、sandwich 培養肝細胞を利用することで、種々の薬物の胆汁排泄過程に関与するトランスポーターを同定することに成功した。また、腎臓においては、ヒトにおいて OAT1, OAT3 の機能をフェノタイプピングするためのプローブ薬、プローブ阻害剤を *in vitro* 実験により選択し、臨床研究の結果、一部が実際に用いることを示すに至った。さらに、薬物や phytoestrogen の精巣や脳移行において、BCRP が重要な役割を果たすことを明確に示した。また、トランスポーターの発現制御メカニズムとして、転写因子のほかに、DNA メチル化による負の制御が関与していることを明確に示した。

A.研究目的

薬物の毒性発現の決定要因のひとつに、薬物動態学的な側面が挙げられる。従って、薬物が、副作用臓器に集積したり、何らかの原因で、消失機構が阻害されたりするなどして、血中濃度が予期せぬ上昇をするなどすることによる副作用が考えられる。これらを推定するためには、汎用されている薬物が、どのような分子により薬物動態が制御されており、それらの相対的な重要性を決めることが重要であると考えられる。さらに毒性発現には、毒性を引き起こす活性本体を作り出す代謝酵素の機能も影響を与えうる。本研究では、*in vitro* 実験系ならびに各種トランスポーター遺伝子ノックアウトマウスなどを用いて、薬物動態・薬効・副作用に関与する複数の分子を同定しうるスクリーニング系の開発ならびにそれらを用いた臨床で使用されている薬剤の評価を試みた。

B.研究方法

(1) ヒト肝細胞に発現する取り込み・排泄トランスポーターが肝臓への分布に与える影響の解析

ヒト肝臓における取り込みトランスポー

ターの解析については、ヒト凍結肝細胞・ヒト取り込みトランスポーターの発現細胞における取り込みを比較することで行なった。また、排泄トランスポーターの解析については、排泄トランスポーター発現膜ベシクルへの取り込み、各種取り込み・排泄トランスポーターを共発現するダブルトランスフェクタントにおける経細胞輸送、サンドイッチ培養肝細胞などを用いた解析を行った。さらに、*in vivo* における意義を調べるために、各種遺伝子ノックアウトマウスにおける薬物の体内動態および各臓器への分布について観察を行なった。

(2) 腎臓に発現する有機アニオンの取込みに関与する OAT (organic anion transporter) 1, OAT3 のヒトにおけるプローブ薬・プローブ阻害剤の開発

ヒト腎臓の取り込みトランスポーターをフェノタイプピング可能な薬物を探索するために、ヒト腎スライスにおける取り込み、OAT1, OAT3 発現細胞を用いた取り込みおよび阻害剤の影響を観察するとともに、OAT1 ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 体内動態解析を行った。さらに、ヒトにおいてこれらを実証するため、OAT1, OAT3 プローブ薬・プローブ阻害剤を用いた

ヒト臨床研究を行なった。

(3) phytoestrogen の体内分布における BCRP(breast cancer resistance protein)の重要性の解析

Phytoestrogen 3 種 genistein, coumestrol, daidzein について、Bcrp および Mdr1a を発現した細胞における経細胞輸送を観察するとともに、Bcrp ノックアウトマウスを用いて、各薬物の体内動態や臓器分布を観察した。あわせて、Bcrp の精巣や精子における局在を免疫染色法により検討した。

(4) エピジェネティクスと転写因子の interplay に基づくトランスポーターの発現制御メカニズムの解析

OAT1 ならびに URAT1 (urate transporter) について、これらの転写上流域をクローニングし、luciferase assay 法を用いて、転写因子の結合に重要な領域を絞り込んだ。さらに、メチル化阻害剤が転写に与える影響を観察したり、一般の発現・非発現臓器におけるトランスポーター遺伝子のメチル化の度合いを調べるために、Bisulfite sequencing 法を用いることで比較したりすることにより、DNA メチル化がこれらトランスポーターの発現に及ぼす影響について観察を行なった。

(倫理面への配慮)

ヒト肝細胞は、あらかじめ販売元の方で、informed consent が書面にて得られたヒトから単離された肝細胞を、一般試薬業者より購入して用いた。ヒト腎臓を用いた研究については、東京女子医科大学の協力により、東京女子医科大学及び東京大学薬学部の倫理委員会の承認の元、あらかじめ informed consent が書面にて得られた患者から摘出した腎病変部のうち正常部分のみを用いることで実験を行っている。ヒト臨床試験については、北里大学東病院臨床治験センターの協力により、あらかじめ北里大学東病院ならびに東京大学薬学部の倫理委員会の承認を得た上で行った。全ての研究は、「臨床研究に関する倫理指針（平成16年厚生労働省告示第459号）」及び細則を遵守して行なった。

C. 研究結果

(1) ヒト肝細胞に発現する取り込み・排泄トランスポーターが肝臓への分布に与える影響の解析

肺動脈性高血圧症治療薬である bosentan の肝取り込み機構について調べたところ、ヒト OATP1B1, OATP1B3 発現細胞に有意に取り込まれることが明らかとなり、また、各トランスポーター選択的な基質の取り込み能力を発現細胞とヒト肝細胞の間で比較することで、relative activity factor (RAF)法に基づき、双方のトランスポーターの寄与率を算定したところ、両トランスポーターがともに肝取り込みに同程度寄与していることを明らかにした。また、fexofenadine に関しては、これまでヒトにおける胆汁排泄トランスポーターが明らかにされてきていなかったが、ヒト共発現細胞を用いて経細胞輸送を観察すると、OATP1B3/BSEP, OATP1B3/MRP2 発現細胞において有意な方向性輸送が見られたことから、fexofenadine は、少なくとも BSEP, MRP2 の基質になることが明らかとなった。しかしながら、Mrp2 ノックアウトマウスにおいて、野生型マウスと比較して、fexofenadine の肝臓中濃度基準の胆汁排泄はあまり大きく低下しなかったことから、少なくともマウス in vivo では、Mrp2 は限定的な役割しか果たさないことが示された。一方、血管側に発現する排泄トランスポーター Mrp3 の基質になることを、Mrp3 発現ベシクルにおける取り込み能力より明らかにしており、Mrp3 ノックアウトマウスにおいては、肝クリアランスの減少が見られたことから、fexofenadine の体内動態に、Mrp3 が関与していることを示した。また、肝指向型の angiotensin II 受容体拮抗薬である telmisartan の主代謝物である telmisartan glucuronide (tel-glu)の胆汁排泄トランスポーターを明らかにするために、取り込みトランスポーターの寄与を調べたところ、OATP1B3 により主に肝取り込みされていることが明らかとなった。そのため、新たに OATP1B3/MRP2, OATP1B3/MDR1, OATP1B3/BCRP の共発現細胞を構築し、tel-glu の経細胞輸送を評価した結果、MDR1, MRP2, BCRP 全ての基質となることが明らかとなった。

また、intactな肝細胞で胆汁排泄を評価できる系として、sandwich培養肝細胞の実験系を確立し、Ca²⁺-free bufferを用いることで、bile pocket中に排泄されるリガンドの時間依存的な量を見積もり、in vitro実験から得られたデータをもとにin vivoにおける胆汁排泄クリアランスを予測したところ、大体in vitroからの予測値が、in vivoの実測のクリアランスと比較して、1/10程度で良好に相関することが明らかとなった。さらに、胆汁排泄トランスポーターの相対的な寄与率を評価するために、MDR1, MRP2, BCRPそれぞれの選択的阻害剤を探索し、それらを用いることで、3種類のHMG-CoA還元酵素阻害薬の胆汁排泄に関わるトランスポーターの寄与率が異なることを明らかにした。

(2) 腎臓に発現する有機アニオンの取込みに関与するOAT1, OAT3のヒトにおけるプローブ薬・プローブ阻害剤の開発

OAT1, OAT3の臨床にてヒトに投与しうる選択的基質(プローブ薬)の候補として、adefovir, benzylpenicillin (PCG)を選択し、OAT1の選択的阻害剤としてp-aminohippurate (PAH)、OAT1, OAT3の両方の阻害剤として、probenecidを用いて、in vitro発現系やヒト腎スライスにおける検討を行ったところ、PAHは、adefovirの取り込みを阻害するものの、PCGの阻害能は非常に弱く、一方で、probenecidは、adefovir, PCGの取り込みを同程度の阻害定数で阻害した。さらに、OAT1ノックアウトマウスにおいて、adefovirの腎分泌クリアランスが著しく低下することを示し、in vivoにおけるOAT1の重要性を確認できた。さらに、ヒト臨床試験において、健常人男性を6名ずつ4群にわけ、各群に、adefovir+PAH, adefovir+probenecid, PCG+PAH, PCG+probenecidを、阻害剤の濃度を4期に分けて徐々に上昇させていくことで、基質薬物に対する影響を観察した。その結果、adefovirは、PAH, probenecid双方の同時投与により、投与量依存的な血中濃度の上昇が観察されたが、予想と反して、PCG+PAHの投与により、PAHの投与量を上げると、PCGの血中濃度が下がるという現象が見られた。

(3) phytoestrogenの体内分布におけるBCRPの重要性の解析

In vitro実験で、P-gp, Bcrpそれぞれの発現細胞を用いて経細胞輸送を観察した結果、Genisterin, daidzein, coumesterolはいずれもP-gpの良好な基質にはならないものの、Bcrpの良好な基質にはなることが明らかとなった。また、Bcrpノックアウトマウスにおいて、genistein, daidzeinの血中濃度の上昇が見られた一方、3化合物とも、脳や精巣への移行は野生型マウスと比較して有意な上昇が見られた。さらに、Bcrpの精巣での発現局在を免疫組織染色法により明らかにした。

(4) エピジェネティクスと転写因子のinterplayに基づくトランスポーターの発現制御メカニズムの解析

HNF1 α -null mouseにおいて、OAT1の発現量が有意に低いことをうけて、HumanおよびmouseのOAT1遺伝子の上流をluciferase遺伝子につないだconstructによるluciferase assayを行なったところ、HNF1結合サイトに変異を入れたもの、もしくは欠損させたものでは、HNF1 α /HNF1 β による転写制御がみられないことが明らかとなった。また、その部位にHNF1 α のホモダイマーもしくは、HNF1 α / β のヘテロダイマーの直接的な結合がgel-shift assayにより明らかとなった。一方、human URAT1遺伝子についても、同様のluciferase assayの結果から、HNF1 α /HNF1 β による正の発現制御がかかっていることを明らかにした。一方で、URAT1は、腎臓の皮質に選択的に発現しているが、そのメカニズムとして、上流域のDNAメチル化状態を、bisulfite sequencing法を用いて検討したところ、肝臓や腎臓の髄質においてhuman URAT1遺伝子は高メチル化状態にあったが、腎臓の皮質においては、低メチル化状態にあったことから、メチル化が解除されていて、かつHNF1 α /HNF1 β の存在が、URAT1の発現に重要であることを示した。

D. 考察

薬物の毒性発現において重要な因子の1つに、毒性発現部位への薬物の集積が挙げ

られる。それを担う分子として、数多くの取り込み・排泄トランスポーター群が重要であると考えられる。本研究では、トランスポーター群がいろんな組織においてどのような役割を果たしている、それが毒性発現にどのように関与するのかについて多角的な観点から検討を進めている。

bosentan は、比較的高頻度に肝機能異常を引き起こす薬剤として知られていることから、その肝集積メカニズムは毒性発現を考える上で重要であり、OATP1B1, OATP1B3の機能が、bosentanの肝集積を決定付けていることが明らかとなった。また、肝集積する薬物について、どのトランスポーターが関与しているのかを取り込み・排泄両方について簡便に決定する系として、極性細胞に取り込み・排泄両方のトランスポーターを同時発現させたダブルトランスフェクタントをこれまで構築してきた。これまでは、肝取り込み過程に最も重要であろうと考えられてきた OATP1B1 を取り込み側に持つ細胞系を構築してきたが、本年度は、tel-glu のように、主に OATP1B3 により肝取り込みされるような化合物に対処するために、新たに、OATP1B3 と排泄トランスポーター(MDR1, MRP2, BCRP)を発現する共発現細胞を構築し、tel-glu の胆汁排泄トランスポーターを同定するに至った。さらに、抗アレルギー薬である fexofenadine については、少なくとも rat Mrp2, mouse Mdr1, mouse Bcrp が胆汁排泄に果たす役割は見られないことが動物実験レベルでは示されており、胆汁排泄トランスポーターの候補がはっきりしていなかったことと、ヒトにおける胆汁排泄トランスポーターの基質認識性が不明であったことから、共発現細胞を用いて基質になる排出トランスポーターを決定したところ、MRP2に加えて、BSEPが見つかった。これまで BSEP は、胆汁酸の専用のトランスポーターであると考えられてきたが、近年、pravastatin など非胆汁酸も基質とすることが報告されており、現時点で、in vivo における fexofenadine の胆汁排泄における寄与は明らかではないが、今後、薬物の胆汁排泄においても、BSEP も候補に考えなければならないことを示した好例で

あるといえる。さらに、遊離肝細胞の状態では、排泄トランスポーターは通常内在化することが知られており、機能評価はできないとされていたが、sandwich 培養肝細胞の系を用いることで、胆汁排泄トランスポーターが bile pocket 上に局在し、培養日数が経過しても、あまり発現量が低下しないことが報告されていたことから、当研究においても、本実験系の立ち上げを行った。さらに、胆汁排泄トランスポーターの寄与率を調べるために、MDR1, MRP2, BCRP それぞれについて選択的な阻害剤を探索し、適切な濃度設定をすることが、それぞれのトランスポーターを選択的に阻害できる条件を見出した。さらに、3種類の非代謝性の statin について、上記阻害剤を試したところ、いずれも異なる結果が見られた。いずれも肝胆系に効率よく集積するという共通特性を有しているが、その分子メカニズムは、薬物により異なることを示しており、非常に興味深い知見であるといえる。

また、腎臓においては、有機アニオンの取込みに重要な役割を果たす OAT1, OAT3 のヒト臨床において使用しうるプローブ薬物・プローブ阻害剤の探索を行なった。臨床試験の結果、おそらく adefovir は、OAT1 プローブ薬として、また、PAH は、OAT1 選択的阻害剤として用いることが分かったが、PCG に関しては、再吸収のためか予想と異なる阻害プロファイルを示したことから、OAT3 のプローブ薬になるかは結論付けられなかった。今後、in vitro 実験系を用いて、OAT3 選択的な臨床で投与しうるプローブ薬の探索を続けていく予定である。OAT1, OAT3 はいずれも遺伝子多型の頻度が極めて低い一方で、mRNA 発現量には、非常に大きな個人差があることが報告されており、遺伝的要因だけではヒトにおける OAT1, OAT3 の機能変動は説明できない。従って、このようなプローブ薬の体内動態を利用してトランスポーターの機能を測ることが出来れば、非常に有用であると考えられる。

次に、phytoestrogen の脳内および精巣内移行に、BCRP が関与していることを in vivo ノックアウトマウスを用いて明らかにした。

Phytoestrogen は、脳や精巣内においてホルモン様作用を有していることから、BCRP の機能変動により、これらホルモンの脳や精巣への曝露が変化し、神経や生殖毒性を示す可能性が考えうる。また、BCRP は数多くの薬物も基質とすることから、これら毒性を引き起こす前段階としての薬物の集積メカニズムとして、今後 BCRP の役割を検討していく必要があることを示すに至った。

また、OAT1, URAT1 といった腎臓に選択的に発現しているトランスポーターの発現を支えるメカニズムとして、HNF1 α /HNF1 β といった conventional な転写因子に加えて、新たに DNA メチル化がこれらの転写制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。従って、今後、DNA メチル化の動的な制御が見られた場合、トランスポーターの発現の個人差や発現変動にも影響を与える新たな要因になる可能性が考えられ、今後更なる検討が必要であると考えている。

E. 結論

肝臓における取り込み・排泄メカニズムを明らかにするための実験系として、OATP1B3 を取り込み側に持つダブルトランスフェクタントや、sandwich 培養肝細胞実験系と選択的阻害剤を用いた寄与率評価系を構築した。さらに、多様な薬物に対して、これら評価系を試すことで、共通に肝集積性を示す薬物が、多様なメカニズムで肝臓への取り込み・排泄に関与することが明らかとなった。また、腎臓については、OAT1, OAT3 のプローブ薬物の候補を選択し、臨床試験を通じて、一部使用可能なものを見出すことに成功した。また、BCRP が精巣や脳への phytoestrogen の移行に関与することを示し、神経・精巣毒性を決める新たな要因としての BCRP の可能性を示した。また、これらトランスポーターの制御メカニズムとして、転写因子と DNA メチル化の両方の協調的な関与が重要であることを見出した。これらの知見は、薬物の組織集積のメカニズム解明とその制御に対していずれも有用な情報を与えているといえる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Aoki K, Nakajima M, Hoshi Y, Saso N, Kato S, Sugiyama Y and Sato H. Effect of aminoguanidine on lipopolysaccharide-induced changes in rat liver transporters and transcription factors. *Biol Pharm Bull*, 31(3), 412-420 (2008)
- (2) Ishiguro N, Maeda K, Saito A, Kishimoto W, Matsushima S, Ebner T, Roth W, Igarashi T and Sugiyama Y. Establishment of a set of double transfectants coexpressing organic anion transporting polypeptide 1B3 and hepatic efflux transporters for the characterization of the hepatobiliary transport of telmisartan acylglucuronide. *Drug Metab Dispos*, 36(4), 796-805 (2008)
- (3) Matsushima S, Maeda K, Hayashi H, Debori Y, Schinkel AH, Schuetz JD, Kusuhara H and Sugiyama Y. Involvement of multiple efflux transporters in hepatic disposition of fexofenadine. *Mol Pharmacol*, in press (2008)
- (4) Saji T, Kikuchi R, Kusuhara H, Kim I, Gonzalez FJ and Sugiyama Y. Transcriptional regulation of human and mouse organic anion transporter 1 by hepatocyte nuclear factor 1 alpha/beta. *J Pharmacol Exp Ther*, 324(2), 784-790 (2007)
- (5) Enokizono J, Kusuhara H and Sugiyama Y. Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of

phytoestrogens. *Mol Pharmacol*, 72(4), 967-975 (2007)

(6) Kikuchi R, Kusuhara H, Hattori N, Kim I, Shiota K, Gonzalez FJ, Sugiyama Y. Regulation of tissue-specific expression of the human and mouse urate transporter 1 gene by hepatocyte nuclear factor 1 alpha/beta and DNA methylation. *Mol Pharmacol*, 72(6), 1619-1625 (2007)

2. 学会発表

(1) 平松万里子, 前田和哉, 竹澤俊明, Bi Y-A, Brouwer KR, 杉山雄一 サンドイッチ培養肝細胞を用いた薬物の胆汁排泄過程におけるトランスポーターの寄与の検討 日本薬剤学会第22年会, 2007.5, 埼玉

(2) 佐治孝実, 菊地良太, 楠原洋之, Kim I, Gonzalez FJ, 杉山雄一 Hepatocyte Nuclear Factor 1a/b によるヒト及びマウス Organic Anion Transporter 1 の発現制御 日本薬剤学会第22年会, 2007.5, 埼玉

(3) 久保和也, 前田和哉, 杉山雄一 エンドセリン受容体阻害薬ボセンタンの肝臓への取り込みに対する OATP ファミリートランスポーターの関与 第15回肝病態生理研究会, 2007.5, 東京

(4) 前田和哉, 松島総一郎, 楠原洋之, 杉山雄一 抗ヒスタミン薬 Fexofenadine の肝輸送に関与するトランスポーターの同定 第15回肝病態生理研究会, 2007.5, 東京

(5) Matsushima S, Maeda K, Hayashi H, Debori Y, Schinkel AH, Adachi M, Schuetz JD, Kusuhara H and Sugiyama Y. Role of various efflux transporters in the pharmacokinetics of fexofenadine in the liver. 4th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery

(WCDATD), 2007.6, Kanazawa

(6) Sugiyama Y. Predicting drug disposition and response in individual patients. 6th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, 2007.6, Budapest, Hungary

(7) Sugiyama Y. Strategies to drug discovery and drug development in pharmaceutical sciences. 6th Symposium New Developments in Clinical Pharmacy and Clinical Pharmacology, 2007.6, Munich, Germany.

(8) Sugiyama Y. Integration of in vitro and in vivo data of DDI and GPs based on PBPK modeling. *BioMedical Transporter* 2007, 2007.8, Bern, Switzerland.

(9) Maeda K, Hiramatsu M, Bi Y-A, Takezawa T and Sugiyama Y. Analysis of the contribution of efflux transporters to the biliary excretion of drugs using B-CLEAR[®] (sandwich-cultured rat hepatocytes). 6th World congress on Alternatives & Animals Use in the life sciences, 2007.8, Tokyo

(10) Enokizono J, Kusuhara H and Sugiyama Y. Cooperative detoxification of xenobiotic compounds by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and sulfotransferases. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai

(11) Ichihara S, Kikuchi R, Maeda K and Sugiyama Y. Transcriptional regulation of human organic anion transporting polypeptide 1B3 in cancer. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai

(12) Ose A, Kusuhara H, Tohyama K, Kitamura S and Sugiyama Y. The role of mouse Oatp1a4 in the uptake and efflux of organic anions across the blood-brain barrier. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai

- (13) Saji T, Kikuchi R, Kusuhara H, Kim I, Gonzalez FJ and Sugiyama Y. Transcriptional regulation of human and mouse organic anion transporter 1 by hepatocyte nuclear factor 1a/b. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai
- (14) Watanabe T, Maeda K, Kusuhara H and Sugiyama Y. Prediction of the hepatic and renal clearance of transporter substrates from in vitro uptake assays. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai
- (15) Saito A, Ishiguro N, Maeda K, Kishimoto W, Ebner T, Roth W, Igarashi T and Sugiyama Y. Characterization of the transcellular transport properties of OATP1B3 substrates in new versions of double transfected MDCKII cells, OATP1B3/MDR1, OATP1B3/MRP2 and OATP1B3/BCRP. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai
- (16) Kishimoto W, Ishiguro N, Maeda K, Saito A, Ebner T, Roth W, Igarashi T and Sugiyama Y. OATP1B3 is the predominant transporter isoform responsible for the hepatic uptake of the acylglucuronide of the angiotensin II receptor antagonist, telmisartan. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai
- (17) Kikuchi R, Kusuhara H, Shiota K and Sugiyama Y. Ontogenic regulation of organic anion transporters in mouse kidney. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai
- (18) Maeda K, Matsushima S, Hayashi H, Debori Y, Schinkel AH, Adachi M, Schuetz JD, Kusuhara H and Sugiyama Y. Involvement of multiple transporters in the efflux of fexofenadine in liver. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai
- (19) Sugiyama Y. PBPK Modeling for Transporter-mediated Drug Disposition in the Body: Prediction from In Vitro to In Vivo and from Animal to Human. The 8th International ISSX meeting, 2007.10, Sendai
- (20) Sugiyama Y. Transporter-based Drug Interactions: When Have We Been Are We going? AAPS Workshop on Enzyme and Transporter Based Drug Interactions, 2007.11, San Diego, USA.
- (21) 渡辺友子、前田和哉、楠原洋之、杉山雄一 in vitro 実験の取り込みクリアランスに基づく薬物トランスポーター基質の肝腎クリアランスの予測 第29回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2007.11、仙台
- (22) Sugiyama Y. The role of influx and efflux transporters in drug disposition. Joint Meeting of the Southeast Asian Western Pacific Regional Federation of Pharmacologists and the Australasian Society of Clinical and Experimental Pharmacologists and Toxicologists, 2007.12, Adelaide, Australia.

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

研究要旨 小腸に発現する BCRP (*ABCG2* gene) のヒトでの基質薬物の体内動態への関与は不明である。*ABCG2* (421C>A) と *NAT2* 遺伝子型が既知の健常成人 37 名に 2000 mg のスルファサラジン (SASP) を経口投与し、多型の影響とともに生体中での機能解析を試みた。*ABCG2* 遺伝子多型について、C/C、C/A、A/A 型の SASP AUC_{0-48} は、それぞれ、 171 ± 85 、 330 ± 194 、 592 ± 275 であり、各群間に有意差が認められた。さらに、SASP の活性体であるスルファピリジン (SP) の AUC_{0-48} は、*ABCG2*-A allele をホモ型で有する場合に高い値を示す傾向が認められた。一方、*NAT2* 遺伝子多型について、 AUC_{AcSP}/AUC_{SP} 比は、intermediate acetylator や slow acetylator に比べ、rapid acetylator で有意に高かった。さらに、SASP、SP、AcSP の体内動態を同時モデリングすることを目的に多型を考慮した母集団解析を行った。3 化合物の動態を良好に記述するモデルを作成し、多型の定量的評価に成功した；例えば、算出された Fr (相対的 bioavailability) は、*ABCG2* -C/C:C/A:A/A = 1:1.7:2.1 であった。変異により吸収率が増加することを意味する。SASP が BCRP の良好な基質であること、BCRP が小腸での薬物吸収に重要な機能を有していること、吸収率の個人差の原因の 1 つであることが示唆された。

A. 研究目的

BCRP は、主に小腸上皮細胞の管腔側に発現する ABC トランスポーターである。薬物の吸収を阻害する作用に働くことが予想されているが、ヒトでの検討は少なく、その機能は不明である。BCRP の遺伝子である *ABCG2* には、輸送機能に影響する変異が存在する。本研究では、*ABCG2* 遺伝子変異を有する健常成人を対象に基質薬物であるスルファサラジン (SASP) を投与し、多型の体内動態への関与とともに、生体中での BCRP の機能評価を目的とする。また、SASP の活性体であるスルファピリジン (SP) は遺伝的代謝多型の存在が知られている *NAT2* でアセチルスルファピリジン (AcSP) に代謝されることが知られている。SASP、SP、AcSP の体内動態を同時に記述可能なモデルを構築し、多型の定量的評価を第 2 の目的とした。

B. 研究方法

対象：*ABCG2* (421C>A) ならびに *NAT2* (*4, *5B, *6A, *7B) 遺伝子型が既知の健常成人 37 名を対象とした。

プロトコール：2000 mg の SASP (裸錠) を経口投与し、0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24, 36, 48 時間後に採血を行った。血清に分離後、分析まで -20°C で保管した。また、0-24, 24-48 時間の蓄尿を行った。

濃度測定：SASP、SP、AcSP の血中、尿中濃度は HPLC により測定した。

動態解析：モーメント解析ならびに母集団動態解析を実施した。AUC を算出後、CL/F ならびに CLr を算出した。NONMEM は version V, level 1.1 を使用した。

統計解析：ANOVA の後、Fischer の検定を行い、群間比較を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析に使用した DNA は連結不可能匿名化された試料であり、本研究の目的等、倫理指針に準拠した説明を行い、書面による承諾を得た後に使用した。さらに、総ての研究は、関連研究機関総てのゲノム倫理審査委員会で、審査・承認を受けた後実施した。臨床試験は、臨床試験を専門とする医療機関において実施した。

C. 研究結果と考察

ABCG2-421C/C (n = 12) 、C/A (n = 16) 、A/A (n = 9) 群における SASP の AUC_{0-48} の平均値 (\pm S.D.) はそれぞれ 171 ± 85 、 330 ± 194 、 $592 \pm 275 \mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{ml}^{-1}$ で、各群間において有意な差が認められ、*ABCG2*-421A allele を持つ被験者において有意に増大した。同様に C_{max} は Wild Type (WT) と比較して、*ABCG2*-421A allele を持つ被験者において有意に増大したが、 CL_{total}/F は有意に低下した。BCRP は小腸上皮細胞管腔側や胆管側膜に高発現しているため、*ABCG2*-421A allele による輸送活性の低下が基質薬物の小腸上皮細胞からの吸収の亢進または胆汁排泄の低下を引き起こし、その結果 *ABCG2*-421A allele (s) を持つ被験者において基質薬物の血漿中濃度が上昇したと考えられる。SASP には静脈注射用の製剤がなく F を求めることができないため、SASP の消化管吸収や分泌、胆汁排泄に対してそれぞれ *ABCG2* 遺伝子多型がどの程度影響を与えるのか説明することは困難であるが、 $t_{1/2}$ に *ABCG2* 遺伝子型による有意な差が認められなかったこと、また、ヒトにおける胆汁排泄率は非常に低いことから、胆汁排泄への BCRP の寄与は小さく、*ABCG2* 遺伝子多型の影響は消化管吸収が主なものになると考えられる。

一方、*NAT2* 遺伝子型の影響を除くため *NAT2* 遺伝子型を RA に揃え、その中で SP の体内動態パラメータに *ABCG2* 遺伝子型による違いが認められるか否かを検討したところ、SP の AUC_{0-48} の平均値 (\pm S.D.) は RA-C/C (n = 5) 、RA-C/A (n = 5) 、RA-A/A (n = 3) においてそれぞれ、 140 ± 35 、 134 ± 32 および $84 \pm 28 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であり、SASP とは対照的に、C/C および C/A 型と比較して A/A 型で低くなる傾向が認められた。 C_{max} に関しては A/A 型において有意に低下した。このことから、*ABCG2* 遺伝子型による親化合物 SASP の吸収量の違いが下部腸管で分解生成する SP 量に間接的に影響することが示唆された。また、分解物 SP 及びそのアセチル体 AcSP の体内動態に関して、 $AUC_{\text{AcSP}}/AUC_{\text{SP}}$ は *NAT2*-RA、IA、SA 各群間に有意な差が認められ、従来通り *NAT2*

遺伝子型によって層別化された。

投与後の SP、AcSP は、SASP と比較して遅れて血中に見られることから、この生成ラグタイムを表現するために SP 生成過程に deposit コンパートメントを 3 つ繋いだモデル (Erlang's distribution model) を構築したところ、各化合物の個別の血中濃度 POSTHOC 推定値は実測値と良好な相関を示し、3 化合物の同時モデリングに成功した。影響因子の検証の結果、*NAT2* 多型が CL_{SP} に、*ABCG2* 多型が KA、 CL_{SASP} 、Fr に有意に影響を及ぼすことが明らかとなった。*NAT2* 多型による CL_{SP} の変化は、rapid:intermediate:slow acetylator = 1:0.69:0.18 であり、slow acetylator と rapid acetylator で 5 倍の代謝能の違いが認められた。また、Fr については、C/C:C/A:A/A = 1:1.7:2.1 で、変異を有することで、bioavailability が 1.7~2.1 倍に上昇する結果が得られた。

D. 結論

BCRP が基質薬物の消化管吸収に重要な役割を果たしており、その遺伝子型が基質薬物の体内動態に見る個人差の原因となることが明らかとなった。また、SASP の薬効本体 SP の体内動態には BCRP 及び *NAT2* の両方が寄与することが示唆され、これら二つの遺伝子型を考慮することはより精度の高い個人差解明に重要であると考えられる。また、多型を考慮した母集団解析の導入は多型の定量的評価を可能にし、多型の具体的評価を可能にすると言える。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamasaki Y, Ieiri I, Kusuhara H, Sasaki T, Kimura M, Tabuchi H, Ando Y, Irie S, Ware J, Nakai Y, Higuchi S, Sugiyama Y. Pharmacogenetic Characterization of Sulfasalazine Disposition Based on *NAT2* and

ABCG2 BCRP) Gene Polymorphisms in Humans. Clin Pharmacol Ther. 2008 Jan 2.

2. Ieiri I, Suwannakul S, Maeda K, Uchimaru H, Hashimoto K, Kimura M, Fujino H, Hirano M, Kusuhara H, Irie S, Higuchi S, Sugiyama Y. SLCO1B1 (OATP1B1, an uptake transporter) and ABCG2 (BCRP, an efflux transporter) variant alleles and pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers. Clin Pharmacol Ther. 2007 Nov;82(5):541-7.

2. 学会発表

1. Yamasaki Y et al., Pharmacogenetic Characterization of Sulfasalazine Disposition Based on NAT2 and ABCG2 BCRP) Gene Polymorphisms in Humans. 8th International ISSX Meeting, Sendai, Oct, 2007.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

厚生科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業（トキシコゲノミクス研究））

分担研究報告書

薬剤代謝・トランスポーター遺伝子の SNP 解析キットの開発

分担研究者 徳永勝士・東京大学医学系研究科人類遺伝学分野・教授

研究要旨：前年度に確立した DigiTag2 法は、簡便かつ低コストでマルチプレックス SNP タイピングを行うことができ、また、同一のマイクロアレイを用いて異なる SNP セットをタイピングできるという高い経済性を有している。DigiTag2 法を用いて、既知および新規の薬剤応答性遺伝子群の機能的 SNP を同時並列的に検査することを試み、解析対象とした 45 種類の SNP のうち 39 種類の SNP でタイピングが可能であることが明らかとなった。薬剤応答性遺伝子群の多型を同時並列タイピングする簡便なキットを開発することは、個人化医療の実現に向けた重要な一歩となることが期待される。

A. 研究目的

薬剤応答性の個人差には、薬理メカニズムに存在する機能的多型のほか、薬剤代謝にかかわる遺伝子群および薬剤トランスポーター遺伝子群に存在する機能的 SNP によって引き起こされる血中薬物濃度推移の個人差が大きくかかわっている。これら薬剤応答性遺伝子群の機能的 SNP と各種薬剤への応答性の個人差との関連を明らかにし、医療の場において使いやすい SNP タイピングキットを開発することは、個人化医療の実現のために必要不可欠な要素である。本研究においては、既知および新規の薬剤応答性遺伝子群の機能的 SNP を同時並列的に検査（マルチプレックスタイピング）できる技術を開発し、キットとして実用化することを目指す。

B. 研究方法

DigiTag2 法について

DigiTag2 法は、ターゲット分子調製、エンコード、ラベリング、検出の 4 つの工程で構成される（図 1 参照）。ターゲット分子

調製の工程では、ゲノム DNA をテンプレートとしたマルチプレックス PCR を行い、解析対象となる SNP を含むマルチプレックス PCR 産物を得る。続く、エンコードの工程ではマルチプレックス PCR 産物をテンプレートとしたライゲーション反応を行う。エンコード反応では、解析対象となる SNP ごとに 2 種類の 5'クエリープローブと 1 種類の 3'クエリープローブを用意する。5'クエリープローブは SNP 特異的配列の 5'側と相補的な配列を持つアリルに特異的なプローブである。また、5'クエリープローブには、アリルに対応して 2 種類の ED（ED-1、ED-2）を付加する。加えて、タイピング精度を上げるために、5'クエリープローブの 3'末端に存在する SNP 部位から上流 4 塩基目に mismatch 塩基を導入した。3'クエリープローブは SNP 特異的配列の 3'側と相補的な配列を持つ SNP に特異的なプローブである。また、3'クエリープローブには SNP に対応させて D1 を付加する。ED および D1 は物理的、化学的性質が