

200708005B

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17～19年度 総合研究報告書

主任研究者 杉山 雄一

平成20（2008）年 3月

目 次

I. 総合研究報告書	
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	1
杉山雄一	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	20
III. 研究成果の刊行物・別刷	26

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））

総合研究報告書

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 本研究では、まず毒性発現の一要因としての薬物の臓器分布・体内動態を決定付ける薬物トランスポーターに着目した研究を目指し、肝臓・腎臓・脳・精巣における取り込み・排泄トランスポーターの発現ならびにそれらにより引き起こされる薬物毒性について多くの事例解析を通じて明らかにしてきた。さらに、それらを発見するためのツールとして、取り込み・排泄トランスポーター共発現系の構築、共発現系に血管側への排泄に関わるトランスポーターをさらに発現させたマルチ発現系の構築、サンドイッチ培養肝細胞を用いた排泄トランスポーターの寄与率解析法の構築、ヒト肝細胞を利用した取り込みトランスポーターの寄与率解析法の構築、ノックアウトマウスを用いた動態解析など、非常に多くの実験系・解析法を構築してきた。これらは、毒性発現のメカニズムとなりうる要因をいち早くつかむために重要な実験系であるといえる。さらに、それらの事象を臨床において示すために、遺伝子多型と体内動態との関連を探る意味で、以下の臨床研究を実行した。(1) *SLCO1B1*, *ABCG2*(BCRP)遺伝子多型と pitavastatin 体内動態、(2) *SLCO1B1* 遺伝子多型と pravastatin 服用後のコレステロール低下作用、(3) *NAT2*, *ABCG2* 遺伝子多型とスルファサラジン(SASP)体内動態。また、遺伝子多型を臨床でいち早く評価するための SNPs 検出系として、簡便かつ低コストで数十から数百種の SNP（単一塩基多型）を同時並列（マルチプレックス）タイピングを行うことができる新規技術 DigiTag 法およびその改良型である DigiTag2 法を独自開発した。引き続き、DigiTag2 法による薬剤応答性遺伝子群の機能的 SNP を同時並列タイピングできるキットの開発を試みた結果、大部分の SNP のタイピングに成功した。遺伝子欠失型も含め、より多数の機能的多型を同時にタイピングできるキットの確立に向けた有望な成果が得られた。これらの検討を通じて、毒性発現に関与する可能性のある特にトランスポーター遺伝子群の同定を図るとともに、それらの遺伝子多型による機能変動を臨床研究で示し、その診断法を開発するといった一連の有機的な連携研究により、基礎から臨床への橋渡しが出来たと考えている。

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）

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検証実験を行う。

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

B.研究方法

(1) 有機アニオン性薬物の肝取り込み、胆汁排泄に関わる個々の分子の相対的な寄与率の解明

肝取り込みに関しては、OATP1B1, OATP1B3発現HEK293細胞ならびにヒト凍結肝細胞を用いて、3通りの寄与率の評価

法（選択的基質を用いる方法、選択的阻害剤を用いる方法、直接抗体で発現量を比較する方法）を併用してOATP1B1, OATP1B3の相対的な寄与率を見積もった。胆汁排泄については、遺伝子欠損動物(Mrp2欠損ラット(EHBR)ならびにMdr1(-/-), Bcrp(-/-)マウス)を用いて、定常状態における薬物の血中動態を調べることで、さらに、ヒト取り込み・排泄両トランスポーターを極性細胞に発現させた共発現系OATP1B1/MRP2, OATP1B1/MDR1, OATP1B1/BCRP発現細胞における薬物の経細胞輸送を観察した。

(2) PPAR α , PPAR γ , PPAR α/γ dual agonistsのトランスポーター阻害能の検討及びrat in vivoにおける血清胆汁酸上昇との関連研究

In vitro実験では、有機アニオンの取り込みトランスポーター(OATP1B1, OATP1B3, NTCP)発現HEK293細胞ならびに排泄トランスポーター(MRP2, BCRP, BSEP)を発現する細胞より調製した膜ベシクルを用いて、それぞれの典型的基質の輸送に対する薬物の阻害定数を算出した。テスト薬物としては、PPAR α agonistとして、gemfibrozil, clofibrate, bezafibrate, fenofibrate、PPAR γ agonistとして、troglitazone, troglitazone sulfate, pioglitazone, rosiglitazone、PPAR α/γ dual agonistとして、tesaglitazar, muraglitazar, LM4156を用いた。In vivo実験では、PPAR γ agonist (troglitazone, pioglitazone, rosiglitazone)それぞれをラットに静脈内投与後、経時的に血液をサンプリングし、血清中総胆汁酸、taurocholate濃度を定量し、投与前の濃度との比較を行うとともに、血中の薬物濃度(troglitazoneについては、親化合物及び硫酸抱合体)を定量した。さらに、投与60分後に動物より肝臓を摘出し、肝臓内の薬物の濃度を定量した。

(3) 抗HIV治療薬adefovirの腎毒性発現に関与する輸送担体・代謝酵素の同定

腎取り込みトランスポーターOAT1, OAT3発現HEK293細胞におけるadefovirの取り込みを測定し、あわせてヒト腎スライスにおける経時的なadefovirの取り込みを観察した。腎排泄側トランスポーターの解析については、MRP4発現膜ベシクルを用いた取り込みを観察するとともに、MRP4ノックアウトマウスを用いて、adefovirの定常状態における血中濃度ならびに腎臓内濃度を比較した。

次に、adefovirの毒性発現のために必須であるリン酸化に関与する酵素群を同定する

目的で、adenylate kinase (AK) 2, 3, 4を発現HEK293細胞を作製し、adefovirの濃度依存的な細胞増殖抑制効果を観察した。また、ミトコンドリアへのadefovirの取り込み機構を明らかにするために、単離ミトコンドリアへの $[^3\text{H}]d\text{CTP}$ の取り込みに対するadefovirならびにadefovirの2リン酸化体の影響を観察した。

(4) 脳および精巣への薬物・外来異物の移行におけるBCRPの関与

BCRP発現MDCKII細胞ならびにMdr1a発現LLC-PK1細胞をtranswell上に播種し、basalおよびapical方向への経細胞輸送を観察した。BCRPノックアウトマウスと野生型マウスを用いて定常状態における薬物の脳および精巣対血漿中濃度比を比較した。

(5) 肝血管側膜上に存在するMRP3, MRP4が薬物の体内動態に与える影響に関する検討

MRP3, MRP4それぞれのノックアウトマウスおよび野生型マウスを用いて、薬物を静脈内投与後の血中濃度推移の違いを観察した。さらに、MRP3, MRP4の機能をin vitro実験における経細胞輸送の変化でとらえることのできる新規実験系であるトリプルトランスフェクタントを構築した。本発現系は、ヒトOATP1B1/MRP2共発現系に、MRP3, MRP4それぞれを発現できるアデノウィルスに感染させることで、3つのトランスポーターを同時に極性細胞であるMDCKII細胞に発現させた発現細胞である。これをtranswell上に播種し、共発現系におけるbasalからapical方向への薬物の輸送と比較することで、MRP3, MRP4の経細胞輸送に与える影響について考察を行い、in vivoノックアウトマウスから得られた結果との比較を試みた。

(6) 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。

(7) 腎臓に発現する有機アニオンの取り込み

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。

(8) 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。

(9) *SLCO1B1*, *ABCG2* 遺伝子多型とピタバスタチン体内動態

SLCO1B1 および *ABCG2* 遺伝子多型で層別した健常成人を対象とした。ボランティアに pitavastatin を単回投与し、体内動態と遺伝子型との関連を評価した。

(10) *SLCO1B1* 遺伝子多型とプラバスタチン服用後のコレステロール低下作用

pravastatin を長期に服用する患者を対象とした。*SLCO1B1*, *CYP7A1*, *ApoE* 遺伝子型と服用後のコレステロール値変動との関連を長期に渡って評価した。

(11) *NAT2*, *ABCG2* 遺伝子多型とスルファサラジン体内動態

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℃ 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 CL_r 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。

(12) DigiTag 法による代謝酵素・トランスポーター SNPs 迅速診断法の開発

DigiTag 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。DigiTag2 法ではエンコード用オリゴヌクレオチド等を改変してビーズによる抽出過程を省略することにより、操作およびコストの削減を実現した。ターゲット分子調製にはマルチプレックス PCR を行う。エンコードでは SNP 毎に 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いた特異的ライゲーション反応を行う。ラベリングでは、蛍光標識プライマーを用いた PCR を行う。最後の検出では、DNA マイクロアレイとハイブリダイゼーションし、蛍光測定後、各 SNP の対立遺伝子型を決定する。

東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室の協力のもと、薬剤代謝酵素遺伝子群・薬剤トランスポーター遺伝子群の機能的 SNP を 180 種選択した。次にこの中から日本人におけるアリル頻度が 5% を超える SNP を優先的に選択し、最終的に計 45 SNPs を解析対象とした。

(倫理面への配慮)

本研究で用いたヒト肝細胞は、外国にて書面による informed consent に基づき採取されたものを販売会社 (In vitro technologies, Inc. ならびに Research Institute for Liver Disease) を通じて購入して使用している。ヒト腎組織を用いた実験計画については、東京女子医科大学病院ならびに東京大学大学院薬学系研究科に設置された倫理委員会の承認を得ており、あらかじめ同意説明文書により、提供者に説明を行った後、書面による同意が得られた患者より手術で摘出した腎臓の一部を実験に供している。(7) の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。(9)~(11) のヒト臨床試験は、臨床試験専門の医療施設に依頼して行

った。被検者のプライバシーの確保とともに、保険制度、経済的な支援を確保するとともに、実施にあたっては、当該施設の倫理審査委員会ならびに、ゲノム審査委員会での審査、承認の後に実施した。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、総ての研究は鳥取大学医学部倫理審査委員会および九州大学医学部倫理審査委員会においても、審査・承認を受けた後実施した。(12)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) 有機アニオン性薬物の肝取り込み、胆汁排泄に関わる個々の分子の相対的な寄与率の解明

H1-antagonist である fexofenadine、angiotensin II receptor 拮抗薬である telmisartan は、共に OATP1B3 により主に肝取り込みされることを明らかにした。さらに同種の angiotensin II receptor 拮抗薬である valsartan は、OATP1B1、OATP1B3 両方が同程度肝取り込みに関与することが明らかとなり、同じ薬効群の薬物であっても、その肝取り込みの分子メカニズム、相対的な重要性は異なることが示唆された。

また、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 pitavastatin について、Mrp2 欠損ラット (EHBR) で胆汁排泄の遅延は見られず、Mdr1(-/-) マウスを用いた検討でも胆汁排泄の差は見られなかった。一方で、Bcrp(-/-) マウスを用いた検討では、pitavastatin の胆汁排泄がほぼ消失する結果を得た。一方で、pravastatin は、過去に EHBR において胆汁排泄の著しい遅延が認められており、Bcrp(-/-) マウスでは、対照マウスと比較して胆汁排泄速度に変化が見られないことが確認された。さらに、ヒト共発現細胞 3 種類 (OATP1B1/MDR1, OATP1B1/MRP2,

OATP1B1/BCRP) を用いた経細胞輸送実験の結果、pravastatin は、OATP1B1/MRP2 共発現細胞において最も大きな経細胞輸送が観察され多野に対して、pitavastatin は、すべての共発現細胞でほぼ同程度の経細胞輸送が観察された。

(2) PPAR α , PPAR γ , PPAR α/γ dual agonists のトランスポーター阻害能の検討及び rat *in vivo* における血清胆汁酸上昇との関連研究

In vitro 実験において、取り込みトランスポーター (OATP1B1, OATP1B3, NTCP) の発現細胞、ならびに、排泄トランスポーター (BSEP, BCRP, MRP2) の発現細胞より調製した膜ベシクルにおける典型的な基質の輸送に対する各種薬物の阻害能を検討したところ、全体的な傾向として、どのトランスポーターに対しても、PPAR γ agonist の阻害能が最も強く、ついで、PPAR α/γ dual agonist, PPAR α agonist の順であった。また、特に PPAR γ agonist 3 種に焦点を当て、胆汁酸トランスポーターにより胆汁うっ滞の可能性に関する検討を *in vitro*, *in vivo* の両面から試みた。その結果、*in vitro* 実験では、胆汁酸の排泄トランスポーターである BSEP の阻害について、ラット Bsep よりヒト BSEP に対する輸送阻害のほうが強い傾向が示された。胆汁酸の取り込みトランスポーター NTCP の取り込みに対する K_i 値を調べたところ、troglitazone sulfate が最も小さく、pioglitazone, rosiglitazone は、低親和性の阻害しかかけなかった。一方、rat を用いて血清胆汁酸の上昇と薬物濃度の関係を観察したところ、troglitazone 投与後、troglitazone sulfate が肝臓内で濃縮的に存在した。一方で、pioglitazone, rosiglitazone については濃縮的な取り込みは見られなかった。血清中総胆汁酸ならびに taurocholate 濃度を観察したところ、総胆汁酸濃度では、troglitazone で大きな上昇、pioglitazone でも軽度の上昇が見られたのに対して、rosiglitazone では、上昇が見られなかったが、taurocholate 濃度では、troglitazone だけで上昇が見られた。

(3) 抗 HIV 治療薬 adefovir の腎毒性発現に関与する輸送担体・代謝酵素の同定

Adefovir の OAT1, OAT3 発現細胞における取込みを観察したところ、OAT1 発現細胞においてのみ取込みが観察されたことから、adefovir が OAT1 の基質となることが示唆された。さらに、ヒト腎スライスを用いて

adefovirの取込みに対するp-aminohippurate (PAH; OAT1選択的阻害剤)、benzylpenicillin (PCG; OAT3 選択的阻害剤)ならびにprobenecid (OAT1, 3阻害剤)の影響を観察したところ、PAH, probenecidによっては、adefovirの取込みは有意に阻害されたものの、PCGによっては取り込みの阻害が観察されなかったことから、adefovirの腎取込みには、OAT1が主に関与することが示された。次に、腎排泄トランスポーターとしてMRP4ノックアウトマウスを用いたin vivo実験の結果、血中濃度・腎臓中濃度が有意に高いことが示された。さらに、adefovirの毒性発現には、リン酸化されることが必須であることから、adefovirのリン酸化に関わる酵素を同定するため、adenylate kinase (AK)に着目し、AK2, AK3, AK4それぞれを発現するHEK293細胞を構築し、adefovirの濃度依存的な細胞増殖抑制の効果を観察したところ、いずれの細胞においても、adefovirによる増殖抑制が見られた。また、ミトコンドリア内にadefovirならびにリン酸化体が輸送されるメカニズムを推定するため、dCTPの単離ミトコンドリア画分への輸送を、adefovirはdCTPの輸送を促進し、逆にadefovir2リン酸化体は、dCTPの取込みを阻害した。

(4) 脳および精巣への薬物・外来異物の移行におけるBCRPの関与

BCRPの精巣ならびに精巣上体に染色が確認された。また、BCRPならびにMDR1発現細胞における経細胞輸送を複数の化合物について観察したところ、脂溶性の高い化合物については、MDR1, BCRP両方の良好な基質となり、脂溶性が低くアニオン性を示す化合物については、MDR1よりはBCRPの基質になりやすい傾向があることが示唆された。BCRPノックアウトマウスでは、脳および精巣への分布がBCRPの基質薬物や内分泌かく乱物質・植物エストロゲンなど複数の化合物で上昇が観察された。

(5) 肝血管側膜上に存在するMRP3, MRP4が薬物の体内動態に与える影響に関する検討
潰瘍性大腸炎の薬物であるE3040のグルクロン酸抱合体や、抗がん剤であるCPT-11の活性本体であるSN-38およびそのグルクロン酸抱合体、methotrexateについて、MRP3ノックアウトマウスにおいて有意な血中濃

度の低下が見られたことから、肝臓の血管側において、MRP3が血中へのbackfluxに関与していることが示された。一方、OATP1B1/MRP2/MRP3を同時発現するトリプルトランスフェクタントを構築して、経細胞輸送を観察し、OATP1B1/MRP2共発現系と比較したところ、先にMRP3ノックアウトマウスにおいて、体内動態に差が見られた化合物については、basalからapical側への経細胞輸送が有意に低下することが明らかとなり、in vitro実験系で見られた経細胞輸送低下の割合が大きいほど、in vivoにおける血中濃度の上昇割合も大きいことが示された。

(6) 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。

(7) 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

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* 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、健康人男性を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。

(8) 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。

(9) *SLCO1B1*, *ABCG2* 遺伝子多型とピタバスタチン体内動態

ABCG2 遺伝子多型、421C>A に注目した場合、活性体である acid 体の平均 AUC は、421C/C, 421C/A, 421A/A 群で、81.1, 96.7, 78.2 であり、3 群間で有意な差は見られなかった。一方、*SLCO1B1**15 変異に注目した場合、acid 体の平均 AUC は、*1b/*1b, *1b/*15, *15/*15 群でそれぞれ、81.1, 144.0, 250.0 であり、*15 allele 保有者で有意に高い血中濃度が得られた。一方、lactone 体の平均 AUC は、154.0, 169.0, 153.0 であり、遺伝子型間での差は無かったが、acid 体と同程度の血中濃度推移を示すことが明らかとなった。

(10) *SLCO1B1* 遺伝子多型とプラバスタチン服用後のコレステロール低下作用

プラバスタチン服用後のコレステロール低下作用と遺伝子多型との関連を評価した結果、*pravastatin* 服用初期である16週においては、*15 変異保有者で血中コレステロール低下作用が弱い傾向にあった(-14.1% vs -28.9%)。一方、1年間のモニター終了時においては、遺伝子型間での血中コレステロール低下作用に差は見られなかった。そこで、コレステロール動態に関与する遺伝子として、*CYP7A1* と *ApoE* に注目し、関連を評価した。その結果、1年間の長期服用環境下においては、*CYP7A1* の-204C のホモ接合体、*CYP7A1*-204C/*ApoE* e4 のヘテロ接合体で血中コレステロール低下作用に弱い傾向を認めた(-24.3% vs -33.1%)。*15 allele の関与は、投与開始、比較的初期に影響し、長期間投与では影響しないことが示唆された。

(11) *NAT2*, *ABCG2* 遺伝子多型とスルファサラジン体内動態

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。

(12) DigiTag 法による代謝酵素・トランスポーターSNPs 迅速診断法の開発

薬剤代謝酵素では、ワルファリン に関わる VKORC1 および CYP2D9 の SNP や、イソニアジド (INH) などの代謝に関わる NAT2 の SNP などのタイピングに成功した。薬剤トランスポーターでは、肝毒性に関わる ABCC2(MRP2)や血中コレステロールに影響する OATP1B1(SLCO1B1)の SNP などのタイピングに成功した。対象とした 45 種の内 39 種の SNP のタイピングに成功した。

D. 考察

有機アニオンの肝取り込みに対する OATP1B1, OATP1B3 の相対的な寄与は薬物により異なり、薬物動態の予測のためには、1B1, 1B3 両方の機能を考慮する必要があることを明確にした。さらに、同じ薬効群に属する薬物で、共に肝集積性は高い薬物の肝取り込み機構が、薬物により異なることは、あるトランスポーターの機能・発現変化が誘起された場合に、薬物動態に与える変化が薬物により異なることを意味しており、非常に興味深いと考えている。今後、この寄与の変化が、薬物動態の変化にもたらす影響の違いについて、臨床研究を通じて実証していきたい。さらに、胆汁排泄トランスポーターについても、同効薬であるにも関わらず寄与が異なる可能性があることを動物実験で示した。一方、pravastatin については、ヒトトランスポーター共発現系から得られたデータと動物実験の結果に関連性が伺えるが、pitavastatin では、MDR1, MRP2, BCRP に同程度輸送されることから、今後、胆汁排泄過程の寄与率の種差を検討する必要があると考えられる。

有機アニオントランスポーター複数種に対して、典型的な基質の輸送に対する阻害能を比較したところ、PPAR γ agonist でどのトランスポーターに対しても比較的強い阻害能が見られた。従って、薬効の母核が、有機アニオントランスポーターの阻害に関わる部分と共通の構造を有している可能性が考えられ、薬効群でトランスポーターの

阻害能が決定される可能性があることが示唆された。臨床血中濃度から考えると、今回見られた阻害の程度では、一部の例を除いては、薬物間相互作用などにつながるような阻害にはいたらないであろうことが定量的に推測された。一方で、胆汁酸の取り込み・排泄に関わるトランスポーターである NTCP, BSEP については、troglitazone sulfate による阻害は、臨床でも起こりうるが見積もられた。一方で、pioglitazone については、ラットでは阻害が起こりえない肝臓内濃度であったが、BSEP の阻害強度に大きな種差が見出されたことから、ヒトでは、阻害が起こりうる可能性が考えられ、今後臨床における検討が必要であると思われる。

Adefovir は、比較的高頻度に腎毒性を発現することが知られている薬物であり、メインの消失機構は腎排泄であることから、腎臓での輸送メカニズムは、毒性を決定する 1 つの要因になりうる。腎取込みには、主に OAT1 が関与し、排泄には MRP4 が一部関与することが示唆される結果を得た。また、ミトコンドリアでの毒性発現には、adefovir のリン酸化が必須であることが知られており、今回の研究から、adenylate kinase 2,3,4 が役割を担っていることが明らかとなった。また、ミトコンドリアへの dCTP の輸送に対して、adefovir ならびにそのリン酸化体が影響を与えたことから、adefovir やリン酸化体についても、ミトコンドリアへの取込みに関わる何らかの輸送担体の存在が示唆され、今後この同定が毒性の理解につながると考えられる。

BCRP は、脳だけでなく精巣にも発現が認められることが明らかとなった。また、基質として、多くの薬物や植物エストロゲン・内分泌かく乱物質などが受け入れられることが明らかとなった。また、MDR1 との相対的な寄与の検討から、脂溶性が高い基質については、脳や精巣からの排出に MDR1 が主に寄与しており、脂溶性の低い化合物については、BCRP が排出に寄与するといった物性による別の機構を生体が用意することで、あらゆる生体異物に対応するためのシステムが備わっていることが想定される。特に、植物エストロゲンや内分泌かく乱物質などは、生殖毒性を有することが知られており、今後、BCRP の機能変化と毒性への影響について更なる検討を行

う必要があると考えている。

MRP3 が肝血管側膜上において、肝臓内から血管側への backflux に関与することが、ノックアウトマウスを用いた検討から示されており、さらに、*in vitro* 実験により、共発現系にさらに MRP3 を発現させた細胞株を構築することで、経細胞輸送を観察することで、容易に MRP3 の関与を明らかにできる実験系を構築することができた。今後臨床研究を通して、基質薬物の体内動態にどの程度影響を与えるのか、調べていく必要があると考えている。

肝臓における取り込み・排泄トランスポーターの関与を示すための評価系の確立は、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プ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プ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、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られる。

遺伝子多型と薬物動態・薬効との関連を探った臨床研究からは、*SLCO1B1**15 allele の存在で有意に高い血中濃度推移が活性型である acid 体に認められたが、lactone 体には遺伝子型による体内動態の差は観察されず、acid 体と同程度の血中濃度推移が見られたことから、同じ statin であっても分子種によって、異なる *OATP1B1* による認識性が薬物動態の差の有無を生み出していると考えら

れた。また、statin の効果との関連では、*15 allele の関与は、投与開始、比較的初期に影響し、長期間投与では影響しないことが示唆された。*15 変異は輸送能を欠損するものではなく、弱いながらも有していることがその原因の 1 つと考えられる。長期投与では、CYP7A1 や ApoE といった脂質代謝に関与するタンパクの関与が強くなるのが興味深い。従って、HMG-CoA 還元酵素阻害剤の適正使用には、服用する時期に応じたターゲット遺伝子が存在することが示唆された。さらに、sulfasalazine については、BCRP の遺伝子多型により血中濃度上昇が見られたが、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た。今後、他の基質についても検討を進めていきたいと考えている。

また、SNPs 診断法としては、我々が独自開発した DigiTag2 法は、高価な自動装置を用いないで数十種以上の SNP を同時並列タイプピングできるという利点を持つ。薬剤応答性に関与する主要な遺伝子多型を対象としてタイプピングキットを試作し、有望な結果が得られた。今後は今回失敗した SNP についてプライマー・プローブを改良するとともに、今回検討しなかった遺伝子欠失型やその他の機能的 SNP もタイプピング可能なキットの開発を目指したい。

E. 結論

以上の検討より、肝取り込みトランスポーター・胆汁排泄トランスポーターの相対的な寄与率には差があること、胆汁排泄トランスポーターの阻害定数と *in vivo* における臨床血中濃度を考察することで、その薬物が胆汁排泄トランスポーターを阻害して胆汁うっ滞を引き起こす可能性を予測しう

ることが明らかとなった。また、adefovirの腎毒性を決定する要因として、OAT1, MRP4 が関与することが示唆されるとともに、リン酸化を司るAK2,3,4や、ミトコンドリア内に adefovir ならびにリン酸化体を輸送するトランスポーターなどの機能があげられることが示唆された。多くの薬物・化合物の脳内および精巣内移行にBCRPが関与することを示し、BCRPが薬物の精神神経毒性ならびに生殖毒性を決める一要因になりうることを示唆した。さらには、MRP3が、肝臓における血管側へのbackfluxに寄与して、薬物動態に影響を与えることを明らかにするとともに、その効果を *in vitro* 実験系で明らかにする方法論を構築することができた。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、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。

臨床研究を通じて、医薬品の肝輸送には、取り込み過程と排出過程を考慮する必要性をヒトデータにより初めて明らかとした。創薬、適正使用に展開することが必要である

数十種類以上のSNPを簡便、安価に同時並列タイピングできる新規技術DigiTag2法を開発した。これを用いて各種の薬剤応答性遺伝子群のSNPを同時タイピングできるキットVersion 1を作成したところ、大部分のSNPのタイピングに成功した。すなわち、遺伝子欠失型も含め、より多数の機能的多型を同時にタイピングできるキットの確立に向けた有望な成果が得られた。

以上、薬物動態・薬効・副作用に影響を与える一因である薬物トランスポーターに主に焦点をあて、それらの機能変動が薬物により引き起こす現象を、多数の事例につ

いて解析し、またそれらを評価できる新規評価系を構築した。また、臨床試験を通じて、それらの遺伝子多型が血中濃度・効果に影響を与えうることを実証した。さらに、診断キットとしてのSNPsチップの開発に従事し、実用化レベルにまで持ってくることが出来た。

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, Kusuvara H and Sugiyama Y. Involvement of multiple efflux transporters in hepatic disposition of fexofenadine. *Mol Pharmacol*, in press (2008)
- (4) Saji T, Kikuchi R, Kusuvara 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.
- (11) Hirano, M., Maeda, K., Shitara, Y. and Sugiyama, Y. Drug-drug interaction between pitavastatin and various drugs via OATP1B1. *Drug Metab Dispos* 34: 1229-36 (2006)
- (12) Ishiguro, N., Maeda, K., Kishimoto, W., Saito, A., Harada, A., Ebner, T., Roth, W., Igarashi, T. and Sugiyama, Y. Predominant contribution of OATP1B3 to the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Drug Metab Dispos* 34: 1109-15 (2006)
- (13) Mita, S., Suzuki, H., Akita, H., Hayashi, H., Onuki, R., Hofmann, A.F. and Sugiyama, Y. Inhibition of bile acid transport across Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB11)-coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-inducing drugs. *Drug Metab Dispos* 34: 1575-81 (2006)
- (14) Yamashiro, W., Maeda, K., Hirouchi, M., Adachi, Y., Hu, Z. and Sugiyama, Y. Involvement of transporters in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the antitensin II AT1-receptor, in humans. *Drug Metab Dispos* 34: 1247-54 (2006)
- (15) Kikuchi R., Kusuhara H., Hattori N., Shiota K., Kim I., Gonzalez F.J. and Sugiyama Y. Regulation of the Expression of Human Organic Anion Transporter 3 by Hepatocyte

- Nuclear Factor 1{alpha}/beta and DNA Methylation. *Mol Pharmacol.* 70: 887-96 (2006)
- (16) Enokizono J., Kusuhara H. and Sugiyama Y. Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the biliary excretion and intestinal efflux of troglitazone sulfate, the major metabolite of troglitazone with a cholestatic effect. *Drug Metab Dispos.* 35: 209-14 (2007)
- (17) Shitara, Y., Horie, T. and Sugiyama, Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur J Pharm Sci* 27: 425-446 (2006)
- (18) Shitara, Y. and Sugiyama, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther* 112: 71-105 (2006)
- (19) 杉山雄一、前田和哉 第2章「前臨床から臨床試験へのブリッジング」、臨床薬理に基づく医薬品開発戦略、杉山雄一・津谷喜一郎編、廣川書店、pp.15-36 (2006)
- (20) 家入一郎、薬物動態情報の活用 薬物代謝・第1章 遺伝情報に基づいた薬物応答性の個人差解明と医薬品の適正使用への展開、日本医療薬学会 編、医療薬学フロンティア、薬事日報社、東京、2006、pp. 79-99
- (21) Takane H et al., Pharmacogenetic determinants of variability in lipid-lowering response to pravastatin therapy, *J Hum Genet*, 51, 822-6 (2006)
- (22) Ieiri I et al., Genetic polymorphisms of drug transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2, 651-74 (2006)
- (23) Shikata E et al., Human organic anion transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin, *J Hum Genet*, 52, 117-22 (2007)
- (24) Nishida N, Tanabe T, Takasu M, Suyama A, and Tokunaga K: Further development of multiplex SNP typing method, DigiTag2 assay. *Anal. Biochem.*, 364, 78-85 (2007)
- (25) 徳永勝士：遺伝子・ゲノム多型解析法の進展。「臨床ゲノム科学入門」永井良三（監）徳永勝士、山崎力、大木秀一（編）、杏林図書、208-220、2007.
- (26) Hirano, M., Maeda, K., Hayashi, H., Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile acid substrate, pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 876-82 (2005).
- (27) Hirano, M., Maeda, K., Matsushima, S., Nozaki, Y., Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol Pharmacol* 68: 800-7 (2005).
- (28) Hirono, S., Nakagome, I., Imai, R., Maeda, K., Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Estimation of the three-dimensional pharmacophore of ligands for rat multidrug-resistance-associated protein 2 using ligand-based drug design techniques. *Pharm Res* 22: 260-9 (2005).
- (29) Hirouchi, M., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. Treatment of Hyperbilirubinemia in Eisai Hyperbilirubinemic Rat by Transfecting Human MRP2/ABCC2 Gene. *Pharm Res* 22:

- 661-6 (2005).
- (30) Matsushima, S., Maeda, K., Kondo, C., Hirano, M., Sasaki, M., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. Identification of the Hepatic Efflux Transporters of Organic Anions Using Double-Transfected Madin-Darby Canine Kidney II Cells Expressing Human Organic Anion-Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1)/Multidrug Resistance-Associated Protein 2, OATP1B1/Multidrug Resistance 1, and OATP1B1/Breast Cancer Resistance Protein. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 1059-67 (2005).
- (31) Mita S, Suzuki H, Akita H, Stieger B, Meier PJ, Hofmann AF, Sugiyama Y. Vectorial transport of bile salts across MDCK cells expressing both rat Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide and rat bile salt export pump. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288: G159-67 (2005)
- (32) Shimizu, M., Fuse, K., Okudaira, K., Nishigaki, R., Maeda, K., Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Contribution of oatp (organic anion-transporting polypeptide) family transporters to the hepatic uptake of fexofenadine in humans. *Drug Metab Dispos* 33: 1477-81 (2005).
- (33) Hayashi, H., Takada, T., Suzuki, H., Akita, H. and Sugiyama, Y. Two common PFIC2 mutations are associated with the impaired membrane trafficking of BSEP/ABCB11. *Hepatology* 41: 916-24 (2005).
- (34) Hayashi, H., Takada, T., Suzuki, H., Onuki, R., Hofmann, A. F. and Sugiyama, Y. Transport by vesicles of glycine- and taurine-conjugated bile salts and taurothiocholate 3-sulfate: a comparison of human BSEP with rat Bsep. *Biochim Biophys Acta*, 1738: 54-62 (2005)
- (35) 前田和哉, 杉山雄一、IV. がん治療の最前線と今後の展望 7. テーラーメイド治療、2)抗がん剤の効果・副作用に関連する薬剤代謝酵素・トランスポーターの遺伝子多型性、「臨床腫瘍内科学入門」, 金倉 譲編 永井書店 pp.130-137 (2005)
- (36) 前田和哉, 杉山雄一、解毒・排出系の遺伝子多型、「予防医学事典」, 松島綱治、酒井敏行、石川昌、稲寺秀邦編 朝倉書店 pp.220-222 (2005)
- (37) 家入一郎、トランスポーターの遺伝子多型と臨床、臨床化学、vol.34, 5-10, 2005
- (38) 家入一郎、薬物トランスポーターと薬剤感受性(1)-薬物トランスポーター遺伝子多型の臨床的意義-, 最新医学、vol.60, 1827-1832, 2005
- (39) Nishida N, Tanabe T, Hashido K, Hirayasu K, Takasu M, Suyama A and Tokunaga K: DigiTag assay for multiplex SNP typing with high success rate. *Anal. Biochem.* 346(2): 281-288, 2005.
- (40) Bannai M, and Tokunaga K: Single nucleotide polymorphism typing using degenerate-oligonucleotide-primed PCR-amplified products. In: *Whole Genome Amplification*. (Ed. S. Hughes and R. Lasken) Scion Publishing Ltd.: 11-21, 2005.

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

- 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ポ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.
- (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
- (27) Sugiyama Y, "Development of a database with simulation function for quantitative prediction of enzyme and transporter mediated drug interactions", 5th Measurement and Kinetics of In Vivo Drug Effects, 2006.4, Amsterdam, The Netherlands

- (28) 松島総一郎、前田和哉、杉山雄一 ヒト胆管側膜に発現する排出トランスポーターに対する選択的阻害剤の探索に関する基礎検討、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都
- (29) 田迎、前田和哉、杉山雄一 PPAR アゴニストによる肝取込み・排泄トランスポーターに関する検討 - 基質特異性、種差および *in vivo* における意義一、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都
- (30) 山田哲裕、前田和哉、杉山雄一 新規アンジオテンシン II 受容体拮抗薬オルメサルタンの肝輸送過程を決定するトランスポーターの解析、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都
- (31) 林久允、高田龍平、鈴木洋史、大貫玲子、杉山雄一 胆汁酸トランスポーター BSEP/Bsep の輸送機能に関するヒト、ラット間における種差の検討、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都
- (32) 渡邊貴夫、楠原洋之、前田和哉、北村嘉章、杉山雄一 薬物トランスポーターを組み込んだ生理学的薬物速度論モデルの構築、第14回肝病態生理研究会、2005.5、京都
- (33) Sugiyama Y, "Influx and Efflux Transporters in the Blood Brain and Blood-CSF Barriers", The 1st Asia Pacific ISSX Meeting, 2006.5, Jeju, Korea
- (34) Kitamura S, Maeda K and Sugiyama Y, "Involvement of Transporters in the Hepatic Transport of Rosuvastatin", The 1st Asia Pacific ISSX Meeting, 2006.5, Jeju, Korea
- (35) Sugiyama Y, "Computational and *in vitro* Approaches for Predicting Drug Metabolism and Pharmacokinetics in Humans", The 15th World Congress of Pharmacology (IUPHAR2006), 2006.7, Beijing, China
- (36) Sugiyama Y, "Drug transporters in the new drug discovery and development", The 33rd Annual Meeting of the Controlled Release Society, 2006.7, Vienna, Austria
- (37) 石黒直樹、前田和哉、五十嵐隆、杉山雄一 アンジオテンシン II 受容体拮抗薬テルミサルタンおよびグルクロナイドの肝輸送過程を決定するトランスポーターの解析、第33回日本トキシコロジー学会学術年会、2006.7、名古屋
- (38) 田迎、前田和哉、杉山雄一 PPAR α , γ , α/γ agonist 活性を有する薬物群のトランスポーター阻害能に関する検討と *in vivo* 胆汁うっ滞との関連、第33回日本トキシコロジー学会学術年会、2006.7、名古屋
- (39) Sugiyama Y, "Extrapolation and scaling of *in vitro* data to whole organ PBPK models", EUFEPS Conference, 2006.9, Copenhagen, Denmark
- (40) Maeda K, Tian Y, Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann AF, and Sugiyama Y, Assessment of inhibitory effect of many therapeutically important drugs on bile acid transport by NTCP, BSEP and other transporters, Falk Symposium "Bile Acids: Biological Actions and Clinical Relevance", 2006.10, Freiburg, Germany
- (41) Sugiyama Y, "Drug transporters & therapeutic promise: Molecular multiplicity, substrate specificity, drug-drug interaction and genetic polymorphism", The Eighth National Congress on Drug and Xenobiotic Metabolism, 2006.10, Dalian, China
- (42) Sugiyama Y, "Use of Drug Transportation

- in the delivery of new drugs: Role in discovery and development”, Asia Pacific Drug Delivery Global Summit 2006, 2006.10, Shanghai, China
- (43) Sugiyama Y, “Assessment of Transport of New Drug Candidates to Predict the optimum ADME properties”, 2006 AAPS Annual Meeting and Exposition, 2006.10, San Antonio, USA
- (44) Ishiguro N, Igarashi T, Maeda K, Ebner T, Roth W and Sugiyama Y, “Investigation of the transporters responsible for the hepatobiliary transport of a novel angiotensin II receptor antagonist, telmisartan and its glucuronide”, 14th North American ISSX meeting, 2006.10, Puerto Rico, USA
- (45) Kikuchi R, Kusuhara H, Hattori N, Shiota K, Kim I, Gonzalez FJ and Sugiyama Y, “Regulation of the expression of human organic anion transporter 3 by hepatocyte nuclear factor 1 α/β and DNA methylation”, 14th North American ISSX meeting, 2006.10, Puerto Rico, USA
- (46) 榎園淳一、楠原洋之、安達弥永、Schinkel AH, 杉山雄一 BCRP と硫酸基転移酵素の協奏的な解毒機構、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- (47) 楠原洋之、榎園淳一、今岡知己、Schinkel AH、Schuetz JD、杉山雄一 生体防御機構における ABC トランスポーター(BCRP と MRP4)の機能解析、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- (48) 渡辺悦郎、楠原洋之、杉山雄一 Organic solute transporter alpha/beta (OST α/β) の機能解析、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- (49) 尾瀬淳、楠原洋之、遠藤千尋、杉山雄一 有機アニオンの脳移行過程に対するマウス Oatp1a4 の役割、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- (50) 渡邊貴夫、楠原洋之、前田和哉、杉山雄一 トランスポーターを組み入れた生理学的薬物速度論モデリング、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- (51) 菊地良太、楠原洋之、服部中、塩田邦郎、Kim I, Gonzalez FJ、杉山雄一 Hepatocyte nuclear factor 1 及び DNA メチル化による薬物トランスポーターの発現制御、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- (52) 松島総一郎、前田和哉、杉山雄一 フェキソフェナジンの OATP1B3 を介した肝取込みに対する併用薬物の阻害効果の検討、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- (53) 安藤智広、楠原洋之、Merino G, Schinkel AH, 杉山雄一 マウスを用いたフルオロキノロン胆汁中排泄機構の解明、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- (54) 山田哲裕、前田和哉、杉山雄一 オルメサルタンの肝臓・腎臓における輸送メカニズムに関する検討、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- (55) 石黒直樹、前田和哉、斎藤麻美、Ebner T, Roth W, 杉山雄一 アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、テルミサルタンおよびテルミサルタングルクロン酸抱合体の肝輸送過程を決定するトランスポーターの解析、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006.12、東京
- (56) 家入一郎、臨床に役立つ添付文書の科学的な読み方とその活用—相互作用のデータソースを検証する—、医療薬学シンポジ

- ウム (シンポジスト)、大阪、2006年7月
- (57) Nishida N, Tanabe T, Takasu M, Suyama A, and Tokunaga K: DigiTag2 assay for multiplex SNP typing. 56th Annual Meeting, The American Society of Human Genetics. P.227, 2006
- (58) 西田奈央、田邊哲也、高須美和、陶山明、徳永勝士: DigiTag2 法を用いたマルチプレックス SNP タイピング. 日本人類遺伝学会第 51 回大会, P.141, 2006
- (59) 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. 日本 DNA 多型学会第 15 回学術集会, P.55, 2006
- (60) Sugiyama Y, "Assessment of Transcellular Transport of New Drug Candidates to Predict their Hepatobiliary and Renal Clearances", North Jersey Drug Metabolism, 2005.4, East Hanover, USA
- (61) Sugiyama Y, "The impact of OATP transporters and their polymorphism on pharmacokinetics", 3rd World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery, 2005.4, Barcelona, Spain
- (62) 前田和哉、平野雅、石黒直樹、五十嵐隆、Thomas Ebner、Willy Roth、設楽悦久、杉山雄一、ヒト肝細胞を用いた薬物の肝取り込みに関与する トランスポーターの寄与率の解明 ~ピタバスタチンとテルミサルタンを例にとって~, HAB 研究機構学術年会、2005.5、東京
- (63) Maeda, K, Ieiri, I, Yasuda, K, Fujino, A, Fujiwara, H, Otsubo, K, Hiroyuki Kusuhara, H and Sugiyama, Y, IMPACT OF OATP1B1 (OATP-C/OATP2)*1b HAPLOTYPE ON THE PHARMACOKINETICS OF PRAVASTATIN, VALSARTAN AND TEMOCAPRIL IN JAPANESE SUBJECTS, 5th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, 2005.5, Hakone
- (64) 前田和哉, 家入一郎, 保田国伸, 藤野明治, 藤原博明, 大坪健司, 楠原洋之, 杉山雄一、肝取り込みトランスポーター OATP1B1*1b 変異が pravastatin, valsartan, temocapril の体内動態に与える影響、第 13 回肝病態生理研究会、2005.6、大阪
- (65) 林久允, 高田龍平, 秋田英万, 鈴木洋史, 杉山雄一、ヒト Bile salt export pump (BSEP)変異体を用いた進行性家族性胆汁うっ滞症 2 型(PFIC2)発症機構の解析、第 13 回肝病態生理研究会、2005.6、大阪
- (66) 平野雅, 前田和哉, 松島総一郎, 野崎芳胤, 設楽悦久, 楠原洋之, 杉山雄一、新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬ピタバスタチンの胆汁排泄メカニズムの解析 ~BCRP の関与~, 第 13 回肝病態生理研究会、2005.6、大阪
- (67) 北村吏司, 前田和哉, 杉山雄一、新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬ロスバスタチンの肝輸送過程を決定するトランスポーターの解析、第 13 回肝病態生理研究会、2005.6、大阪
- (68) Sugiyama Y, "Variability in Drug Transporters", 2005 European ISSX Meeting, 2005.6
- (69) Maeda, K and Sugiyama, Y., The determination of the contribution of several transporters to the overall hepatic uptake and efflux clearance in humans, Meeting of the European Hepatobiliary Transport Group, 2005.8, St. Gallen, Switzerland
- (70) Maeda, K., Hirano, M., Matsushima, S.,

- Nozaki, Y., Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Breast cancer resistance protein (BCRP) is responsible for the biliary excretion of pitavastatin in mice. 4th International Research Conference on Biomedical Transporters 2005, 2005.8, St. Gallen, Switzerland
- (71) Sugiyama Y, "Prediction of Transporter-Based Drug Interactions", BioMedical Transporters 2005, 2005.8, St. Gallen, Switzerland
- (72) Ishiguro, N, Maeda, K, Ebner, T, Roth, W, Igarashi, T and Sugiyama, Y., Involvement of OATP1B3 in the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, 13th North-American ISSX/20th JSSX joint meeting, 2005.10, Maui, Hawaii
- (73) Sugiyama Y, "Drug Transporters: Roles in New Drug Discovery and Development", 13th NA ISSX Meeting/20th JSSX Meeting, 2005.10, Maui, Hawaii
- (74) Kitamura, S, Maeda, K and Sugiyama, Y. Involvement of transporters in the hepatic transport of rosuvastatin, 13th North-American ISSX/20th JSSX joint meeting, 2005.10, Maui, Hawaii
- (75) 前田和哉, 田迎, 杉山雄一, PPAR α agonist による胆汁酸トランスポーター阻害能および in vivo 胆汁うっ滞に関する検討, 第27回胆汁酸研究会, 2005.10, 弘前
- (76) 前田和哉, 平野雅, 石黒直樹, 北村吏司, 山城わかば, 松島総一郎, 杉山雄一, ヒトにおける薬物の肝取り込み, 排泄に関わるトランスポーターの多様性, 寄与率の評価, 第27回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2005.11, 京都
- (77) 榎園淳一, 楠原洋之, 杉山雄一, マウスの小腸と大腸における Breast cancer resistance protein (BCRP)の発現分布および機能解析, 第27回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2005.11, 京都
- (78) 山縣哲雄, 楠原洋之, 森下真莉子, 高山幸三, 杉山雄一, 医薬品添加物による消化管異物排泄トランスポーターへの影響, 第27回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2005.11, 京都
- (79) 前田和哉, 平野雅, 石黒直樹, 北村吏司, 山城わかば, 松島総一郎, 杉山雄一, ヒト肝臓における薬物の異物解毒能予測のための in vitro トランスポーター実験系の確立: ヒト凍結肝細胞・double transfectants の活用, 第19回日本動物実験代替法学会年会, 2005.12, 神奈川
- (80) 前田和哉, 落合隆文, 小沢直記, 濱義昌, 上田敏之, 阿部由貴子, 菅原紀子, 松井一, 滝克彦, 伊藤清美, 楠原洋之, 杉山雄一, 創薬を指向した薬物トランスポーター情報統合データベース TP-search の構築, 日本薬剤学会第21年会, 2006.3, 金沢
- (81) 渡辺悦郎, 楠原洋之, 杉山雄一, 哺乳類発現系を用いた organic solute transporter alpha-beta の機能解析, 日本薬剤学会第21年会, 2006.3, 金沢
- (82) 平松万里子, 前田和哉, 杉山雄一, 細胞系における共存化合物による排出トランスポーター MRP2(multidrug resistance associated protein 2)の輸送機能促進効果に関する検討, 日本薬剤学会第21年会, 2006.3, 金沢
- (83) 広内幹和, 楠原洋之, 大貫玲子, Borst P, 杉山雄一, MRP3 を介した肝臓中から循環血中への排泄寄与の解析, 日本薬剤学会第21年会, 2006.3, 金沢