

平成 23 年 5 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19689013
 研究課題名 (和文)：正常並びに病態時における小腸及び腎薬物トランスポータの転写制御機構の解明
 研究課題名 (英文)：Molecular mechanisms of transcriptional regulation of the intestinal and renal drug transporters in the normal and disease states.

研究代表者
 寺田 智祐 (TERADA TOMOHIRO)
 京都大学・医学研究科・副薬剤部長
 研究者番号：10324641

研究成果の概要 (和文)：

腎臓に発現する有機アニオントランスポータ 1 (OAT1) をはじめとする 3 種類の薬物トランスポータの基礎転写機構を明らかにした。胆汁うっ滞に腎 OAT3 の発現が上昇し、胆汁酸の尿中排泄を媒介していることを見出した。H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE1) のプロモーター領域に、転写活性に影響を及ぼす遺伝子多型の存在することを発見した。また、Mate1 の遺伝子欠損動物を新たに作成し、MATE1 の腎排泄における役割を *in vivo* で実証した。さらに、MATE のヘテロ型の変異は、糖尿病患者におけるメトホルミンのクリアランスに影響を与えないことを実証した。これらの情報は、薬物トランスポータの病態生理学的意義や個別化薬物療法への応用を考える上で、有用な基礎的知見になりうると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

We demonstrated the basal transcriptional mechanisms of three kinds of drug transporters such as renal organic anion transporter 1 (OAT1). It was found that renal OAT3 is up-regulated during cholestasis, and is responsible for renal secretion of bile acids. We identified a SNP in the promoter region that affecting the promoter activity of H⁺/organic cation antiporter (MATE1). Mate1 knockout mice were newly developed, and we clarified the pharmacokinetic roles of MATE1 *in vivo*. Heterozygous MATE variants could not influence the disposition of metformin in diabetic patients by the clinical pharmacokinetic study. These information should be useful to consider the pathophysiological roles and to apply the personalized pharmacotherapy of drug transporters

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,300,000 円	1,890,000 円	8,190,000 円
2008 年度	4,700,000 円	1,410,000 円	6,110,000 円
2009 年度	4,200,000 円	1,260,000 円	5,460,000 円
総計	15,200,000 円	4,560,000 円	19,760,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：薬物トランスポータ、転写制御、小腸、腎臓、生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

小腸・腎臓・肝臓・脳などに発現する薬物トランスポータは、生体に投与された薬物の膜輸送を媒介し、吸収・分布・排泄を制御している。1990年代前半より薬物トランスポータの分子同定と、それに基づく構造・機能・調節に関する研究が進展し、これら研究成果の薬物療法あるいは創薬への利用が期待されている。一方、ヒトゲノム解読とその薬物療法への応用という観点から、国内外においてファルマスニップコンソーシアムや PharmGKB などの非営利組織が構成され、薬物トランスポータ遺伝子を含めた、薬物動態関連遺伝子の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) 解析が、大規模かつ体系的に行われてきた。しかし、薬物トランスポータ群に関しては、機能変化をもたらす coding SNP (cSNP) の発現頻度は非常に低く、cSNP が個体間変動因子になりうる可能性は低いことが明らかにされた (Urban et al., *Genom Res*, **16**, 223, 2006)。一方、我々は 2000 年頃から、小腸や腎臓に発現する薬物トランスポータの発現情報に着目した解析を進め、トランスポータ発現量の個体差が治療効果や体内動態の個体差を規定する重要な因子であることを実証してきた。

しかし、2005 年頃には、発現量の個体差を規定するメカニズムは言うに及ばず、小腸や腎臓薬物トランスポータの基本的な発現制御機構の情報は皆無であった。さらに、我々を含めた多くの研究者が、生理活性物質、薬物、病態など様々な要因が薬物トランスポータの発現を調節し、基質薬物の体内動態、ひいては薬効・毒性に影響を及ぼすことを明らかにしていたが、転写機構やシグナルパスウェイを解明した報告はほとんどなく、肝代謝酵素や肝薬物トランスポータの転写制御機構の解析が進展している状況とは、非常に対症的であった。このような状況を打破するために、申請者は 2004 年頃から、小腸並びに腎臓薬物トランスポータの転写機構の研究に組み始め、小腸ペプチドトランスポータ PEPT1 の基礎転写機構などを明らかにしたが、その全貌解明にはほど遠い状況であった。

2. 研究の目的

上述した諸問題を解決するため、本研究課題では、ペプチドトランスポータ (PEPT1)、有期カチオントランスポータ (OCT1~OCT3)、有機アニオントランスポータ (OAT1~OAT4)、H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE1、MATE2K) を対象にし、以下の 3 項目について解明することを目的とする。

- ① 上述した薬物トランスポータの転写制御機構の解明
- ② 病態時における薬物トランスポータの発現変動に関するネットワーク機構の解明

③ 薬物トランスポータ発現変動情報の臨床への応用

3. 研究の方法

① 薬物トランスポータの転写制御機構の解明

レポーターアッセイによるプロモーター解析や、ゲルシフトアッセイによる結合実験、さらにバイオインフォマティクスを活用した *in silico* 解析によって、種々薬物トランスポータの基礎転写あるいは発現調節に関わるトランス因子あるいはシスエレメントの同定を行った。

② 病態時における薬物トランスポータの発現変動に関するネットワーク機構の解明

胆汁うっ滞のモデル動物である EHBR を用いて、小腸並びに腎臓薬物トランスポータの発現変動を網羅的にスクリーニングした。発現変動の認められた OAT3 による胆汁酸の輸送解析や、OAT3 の特異的基質である β -ラクタム抗生物質セフォチアムの体内動態パラメータもついで、EHBR と SD ラット間で比較した。

また、MATE1 遺伝子欠損動物を作製し、生理・病理・生化学的特性を精査するとともに、糖尿病治療薬メトホルミンの体内動態解析を行った。

③ 薬物トランスポータ発現変動情報の臨床への応用

メトホルミン服用中の糖尿病患者 48 名を対象に、経時的な血中濃度測定、および MATE、OCT2 の一塩基多型 (SNPs) を調べた。また、メトホルミンの見かけのクリアランス (CL/F) を算出し、これら SNPs との関連について検討した。

4. 研究成果

① 腎臓に発現する有機カチオントランスポータ (OCT2)、有機アニオントランスポータ (OAT1)、H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE1) のプロモーター解析を行い、それぞれの転写制御機構を明らかにした。以下に同定したトランス因子 (シスエレメント) を示す。OCT2: USF1 (E-box)、OAT1: HNF4 α (DR-2, IR-8)、MATE1: Sp1 (GC-box)。MATE1 では、Sp1 結合部位に遺伝子多型が存在することを発見し、その多型によって転写活性が抑制されることを明らかにした。さらに OCT1、肝有機アニオントランスポータ (OATP2B1)、小腸ペプチドトランスポータ (PEPT1) について、それぞれ epigenetic な制御、プロモーター領域の遺伝子多型、日周リズムの発現制御のメカニズムを明らかにした。

②胆汁うっ滞のモデル動物である EHBR を用いて、小腸並びに腎薬物トランスポータの発現変動を調べた。その結果、腎臓の近位尿管上皮細胞の側底膜に発現する OAT3 の発現が上昇することを見出した。EHBR では、血中に加えて尿中에서도胆汁酸が上昇しており、OAT3 は胆汁酸の尿管分泌を媒介していることを、*in vitro* 及び *in vivo* において証明した。さらに、OAT3 特異的な基質セフォチアムの体内動態特性を調べたところ、EHBR におけるセフォチアムの AUC は、SD rat と比べ有意に高く、一方、クリアランスが有意に低いことが明らかになった。従って、血中で上昇した胆汁酸が OAT3 を介したセフォチアム輸送を阻害する可能性が示唆された。

Mate1 ノックアウトマウスは正常に発育し、生化学的検査値や病理組織において著しい異常は認められなかった。また、発現解析によって、Mate1 ノックアウトマウスでは、Mate1 の mRNA 及びタンパク質が発現していないことを確認した。メトホルミンの体内動態解析を行ったところ、Mate1 ノックアウトマウスのメトホルミン血中濃度は野生型マウスと比較して顕著に上昇した。また、メトホルミン投与 60 分後までの尿中排泄量は、Mate1 ノックアウトマウスにおいて 50% 減少した。さらに、Mate1 ノックアウトマウスでは、メトホルミンの腎クリアランスは 1/6 に、また分泌クリアランスは 1/8 に低下した。他の有機カチオントランスポータファミリーの mRNA 発現量は、Mate1 ノックアウトマウスと野生型マウスの間で差は認められなかったことから、メトホルミンの体内動態の変化は Mate1 の欠損に基づくことが示唆された。

③メトホルミン服用中の糖尿病患者 48 名の象患者群において MATE1、MATE2-K、OCT2 の SNPs はいずれもプロモーター領域の遺伝子多型は有していなかった。SNPs はアミノ酸をコードしている領域で認められたがいずれも、ヘテロ型であった。メトホルミン CL/F を求め、野生型とヘテロ型の変異を有する患者間で比較したが、両者で有意な差は認められなかった。さらに、野生型、ヘテロ欠損型 Mate1 ノックアウトマウスを用いて MATE1 のヘテロ型の変異がメトホルミンのクリアランスに与える影響について検証した。その結果、Mate1 ヘテロ欠損型マウスと野生型マウスにおけるメトホルミンのクリアランスに有意な差は認められなかった。以上の結果から、MATE のヘテロ型の変異は、メトホルミンのクリアランスに影響を与えないことが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

以下の論文はすべて査読あり

- 1) Toyama, K., Yonezawa, A., Tsuda, M., Masuda, S., Yano, I., Terada, T., Osawa, R., Katsura, T., Hosokawa, M., Fujimoto, S., Inagaki, N. and Inui, K.: Heterozygous variants of multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) have little influence on the disposition of metformin in diabetic patients. *Pharmacogenet. Genomics*, 20(2), 135-138, 2010.
- 2) Koizumi, A., Terada, T., Harada, K., Nakagawa, H., Inoue, K., Inui, K. and Hitomi, T.: Human organic anion transporter hOAT4 is a transporter of perfluorooctanoic acid. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 105(2), 136-138, 2009.
- 3) Aoki, M., Terada, T., Ogasawara, K., Katsura, T., Hatano, E., Ikai, I. and Inui, K.: Impact of regulatory polymorphisms in organic anion transporter genes in the human liver. *Pharmacogenet Genomics*, 19(8), 647-656, 2009.
- 4) Tsuda, M., Terada, T., Mizuno, T., Katsura, T., Simakura, J. and Inui, K.: Targeted disruption of the multidrug and toxin extrusion 1 (*Mate1*) gene in mice reduces renal secretion of metformin. *Mol. Pharmacol. (Accelerated Communication)*, 75(6), 1280-1286, 2009.
- 5) Tsuda, M., Terada, T., Ueba, M., Sato, T., Masuda, S., Katsura, T. and Inui, K.: Involvement of human multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1) in the drug interaction between cimetidine and metformin in renal epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 329(1), 185-191, 2009.
- 6) Onoue, M., Terada, T., Kobayashi, M., Katsura, T., Matsumoto, S., Yanagihara, K., Nishimura, T., Kanai, M., Teramukai, S., Shimizu, A., Fukushima, M. and Inui, K.: *UGT1A1**6 polymorphism is most predictive of severe neutropenia induced by irinotecan in Japanese cancer patients. *Int. J. Clin. Oncol.*, 14(2), 136-142, 2009.
- 7) Kajiwara, M., Terada, T., Ogasawara, K., Iwano, J., Katsura, T., Fukatsu, A., Doi, T. and Inui, K.: Identification of multidrug and toxin extrusion (MATE1 and MATE2-K) variants with complete loss of transport activity. *J. Hum. Genet.*, 54(1), 40-46, 2009.
- 8) Okamura, M., Terada, T., Katsura, T. and Inui, K.: Inhibitory effect of zinc on the absorption of β -lactam antibiotic ceftibuten via the peptide transporters in rats. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 23(6), 464-468, 2008.

- 9) Kajiwara, M., Terada, T., Asaka, J., Aoki, M., Katsura, T., Ikai, I. and Inui, K.: Regulation of basal core promoter activity of human organic cation transporter 1 (OCT1/SLC22A1). *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 295(6), G1211-G1216, 2008.
- 10) Yokoo, S., Masuda, S., Yonezawa, A., Terada, T., Katsura, T. and Inui, K.: Significance of OCT3/SLC22A3, organic cation transporter 3, expression for the cytotoxic effect of oxaliplatin in colorectal cancer. *Drug Metab. Dispos.*, 36(11), 2299-2306, 2008.
- 11) Saito, H., Terada, T., Shimakura, J., Katsura, T. and Inui, K.: Regulatory mechanism governing the diurnal rhythm of intestinal H⁺/peptide cotransporter 1 (PEPT1). *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 295(2), G395-G402, 2008.
- 12) Chen, J., Terada, T., Ogasawara, K., Katsura, T. and Inui, K.: Adaptive responses of renal organic anion transporter 3 (OAT3) during cholestasis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 295(1), F247-F252, 2008.
- 13) Aoki, M., Terada, T., Kajiwara, M., Ogasawara, K., Ikai, I., Ogawa, O., Katsura, T. and Inui, K.: Kidney-specific expression of human organic cation transporter 2 (OCT2/SLC22A2) is regulated by DNA methylation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 295(1), F165-F170, 2008.
- 14) Ogasawara, K., Terada, T., Motohashi, H., Asaka, J., Aoki, M., Katsura, T., Kamba, T., Ogawa, O. and Inui, K.: Analyses of regulatory polymorphisms in organic ion transporter genes (SLC22A) in the kidney. *J. Hum. Genet.*, 53(7), 607-614, 2008.
- 15) Matsuzaki, T., Morisaki, T., Sugimoto, W., Yokoo, K., Sato, D., Nonoguchi, H., Tomita, K., Terada, T., Inui, K., Hamada, A. and Saito, H.: Altered pharmacokinetics of cationic drugs caused by down-regulation of renal rOCT2 (Slc22a2) and rMATE1 (Slc47a1) in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Drug Metab. Dispos.*, 36(4), 649-654, 2008.
- 16) Nakagawa, H., Hirata, T., Terada, T., Jutabha, P., Miura, D., Harada, K., Inoue, K., Anzai, N., Endou, H., Inui, K., Kanai, Y. and Koizumi, A.: Roles of organic anion transporters in the renal excretion of perfluorooctanoic acid. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 103(1), 1-8, 2008.
- 17) Terada, T. and Inui, K.: Physiological and pharmacokinetic roles of H⁺/organic cation antiporters (MATE/SLC47A). *Biochem. Pharmacol.*, 75(9), 1689-1696, 2008.
- [REVIEW]
- 18) Kajiwara, M., Terada, T., Asaka, J., Ogasawara, K., Katsura, T., Ogawa, O., Fukatsu, A., Doi, T. and Inui, K.: Critical roles of Sp1 in gene expression of human and rat H⁺/organic cation antiporters (MATE1). *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 293(5), F1564-F1570, 2007.
- 19) Ogasawara, K., Terada, T., Asaka, J., Katsura, T. and Inui, K.: 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.
- 20) Asaka, J., Terada, T., Tsuda, M., Katsura, T. and Inui, K.: Identification of essential histidine and cysteine residues of H⁺/organic cation antiporter, Multidrug and Toxin Extrusion (MATE). *Mol. Pharmacol.*, 71(6), 1487-1493, 2007.
- 21) Asaka, J., Terada, T., Ogasawara, K., Katsura, T. and Inui, K.: Characterization of the basal promoter element of human organic cation transporter 2 (hOCT2) gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 321(2), 684-689, 2007.
- 22) Tsuda, M., Terada, T., Asaka, J., Ueba, M., Katsura, T. and Inui, K.: Oppositely-directed H⁺ gradient functions as a driving force of rat H⁺/organic cation antiporter. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 292(2), F593-F598, 2007.
- 23) Terada, T. and Inui, K.: Gene expression and regulation of drug transporters in the intestine and kidney. *Biochem. Pharmacol.*, 73(3), 440-449, 2007. [REVIEW]
- [学会発表] (計 5 件) (筆頭演者のみ)
- 1) 寺田智祐、乾 賢一：質の高いがん専門薬剤師の育成に向けて一京大病院での取り組み、第 19 回日本医療薬学会年会、長崎市、2009.10.25
- 2) 寺田智祐、乾 賢一：薬剤業務としての *UGT1A1* 遺伝子解析、日本病院薬剤師会関東ブロック第 39 回学術大会、長野市、2009.8.30
- 3) 寺田智祐、乾 賢一、薬物トランスポータの遺伝子発現制御、第 23 回日本薬物動態学会年会、熊本、2008.11.27.
- 4) Terada, T., Chen, J., Ogasawara, K., Katsura, T. and Inui, K.: "Pathophysiological roles of renal organic anion transporter 3 (Oat3) in the cholestasis", 2nd Asian Pacific Regional ISSX meeting、上海、2008.5.11-13.
- 5) 寺田智祐、乾 賢一：小腸及び腎薬物トランスポータの基礎と臨床、第 1 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、東京都、2007.12.16
- [図書] (計 5 件)

- 1) 寺田智祐：SLC15A1. 薬物トランスポータ活用ライブラリー, 乾 賢一編集, 36-39, 羊土社, 2009.
- 2) 寺田智祐：SLC15A2. 薬物トランスポータ活用ライブラリー, 乾 賢一編集, 40-42, 羊土社, 2009.
- 3) 寺田智祐, 乾 賢一: H⁺/有機カチオンアンチポータ (MATE/SLC47A) . Annual Review 腎臓 2008, 御手洗哲也, 東原英二, 秋澤忠男, 五十嵐隆, 金井好克 編, 36-42, 中外医学社, 2008.
- 4) Terada, T. and Inui, K.: Impact of drug transport proteins. In Drug Absorption Studies - In Situ, In Vitro and In Silico Models, ed. by C. Ehrhardt and K. Kim, pp.559-576, Springer, New York, 2008.
- 5) 寺田智祐: ペプチドトランスポータを介した薬物吸収の改善. 薬剤師が変える薬物治療2, 乾 賢一監修, 京都大学医学部附属病院薬剤部 編著, 194-199, じほう, 2007.

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

当初は 2007~2010 年度の 4 年間の計画で、1-3 年目に小腸及び腎薬物トランスポータの発現制御機構について解析し、4 年目に臨床薬物動態解析を実施する予定であった。しかし、予想以上に研究が進展し、2-3 年目に、臨床研究を実施することができた。これらの情報を、臨床上問題となっている薬物療法へ繋げていくことが次の課題であると感じ、研究計画最終年度前年度において、基盤研究 (B) に応募し、採択された。従って、若手 A の研究課題は当初の 4 年計画から、3 年で終了したため、2010 年度に得られた主な発表論文などの研究成果はあげていない。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 智祐 (TERADA TOMOHIRO)

京都大学・医学研究科・副薬剤部長

研究者番号：10324641