

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590646

研究課題名(和文) 個別化治療を目指した小腸、腎尿細管薬物トランスポーターのゲノムバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Examination for genomic biomarkers of intestinal and renal drug transporters aiming for the personalized medicine

研究代表者

藤田 朋恵 (Fujita, Tomoe)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：20296510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ガバペンチンの薬物動態の個体差の原因となる可能性のある薬物トランスポーターの1塩基多型(SNPs)の種類と頻度を日本人健康者で調べた。アミノ酸トランスポーター(LAT2)の未知のSNPは、野生型ホモ体2名、ヘテロ体4名、変異ホモ体1名の順で吸収が増加した。73名での各遺伝子型の頻度は33、45、22%であった。腎排泄低下者1名で認められた有機カチオントランスポーター(OCTN1)、有機カチオンプロトン交換輸送体(MATE1)の未知SNPsは集団で検出されなかった。

研究成果の概要(英文)：The study examined a type and frequency of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the drug transporters which may contribute to the inter-individual variability of pharmacokinetics of gabapentin in healthy Japanese volunteers. Regarding with the unknown SNP of L-type amino acid transporter 2 (LAT2), absorption of gabapentin increased in two subjects homozygous for the common allele, four subjects heterozygous and one subject homozygous for the mutant allele in this order. Frequency of these genotypes were 22, 45 and 22%, respectively in 73 Japanese. The unknown SNPs of organic cation transporter 1 (OCTN1) and multidrug and toxin extrusion protein 1 (MATE1) found in one subject whose renal excretion of gabapentin was low, were not detected in this population.

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：ガバペンチン アミノ酸トランスポーター 有機カチオントランスポーター 一塩基多型(SNP) 薬物動態 個別化薬物治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 薬物動態や薬物反応性の違いの原因に薬物トランスポーターの遺伝子多型が知られている。米国 FDA では承認薬の約 10% にゲノムバイオマーカーを認めているが、薬物トランスポーターに関しては一部の「排出型」トランスポーターに限られる。

(2) 本研究で注目しているガバペンチンは難治性の部分発作に対する中枢作用薬で、その吸収と腎排泄に有機カチオントランスポーター (OCTN1) やアミノ酸トランスポーター (LAT2) が媒介すると考えられている。主な副作用に傾眠、浮動性めまいがあり投与初期には用量調節が必要である。長期投与試験では効果不十分による中止例は約 3 割であった。

(3) OCTN1 の変異型ホモ体を持つ多型者では腎排泄が低下する報告がある。我々の行ったガバペンチンの薬物動態および中枢症状を評価した試験においても腎排泄の低下した被験者 1 名に上記と異なる部位である OCTN1 イントロン 5 に 1 塩基多型 (SNPs) が検出され、眠気の増強と血中濃度の増加が示された。

2. 研究の目的

(1) ガバペンチンの吸収と排泄を媒介すると考えられる「取り込み型」薬物トランスポーターの OCTN1 と LAT2 などについて、過去のガバペンチンの臨床試験に参加した被験者のうち、DNA 試料を採取できた 7 名の結果をもとに候補遺伝子多型を検出する。

(2) 検出された多型について、日本人健康成人を対象に上記候補遺伝子多型をスクリーニングする。多型保有者と非保有者でガバペンチンの薬物動態および薬物反応の違いを明らかにし、ガバペンチンの個別化治療においてゲノムバイオマーカーが有用であるかを探索する。

3. 研究の方法

(1) 過去の試験に参加した被験者 7 名での遺伝子解析による候補遺伝子多型の検出と薬物動態との関係

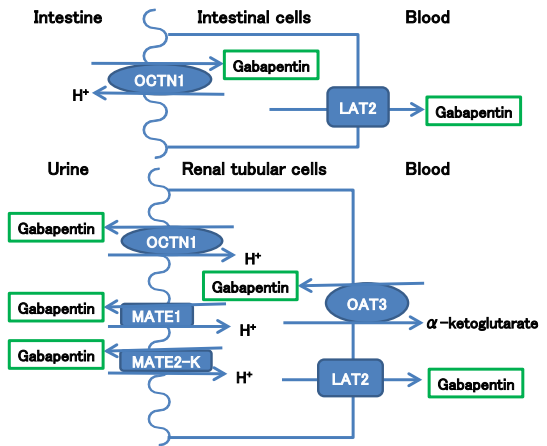
① ガバペンチンの吸収および腎排泄を媒介すると考えられている OCTN1 に加えて、有機カチオンプロトン交換輸送体 (MATE1、MATE2-K)、有機アニオントランスポーター (OAT3) については、既知の機能変化の報告のある SNP をシーケンスにより調べ、LAT2 については、プロモーター (転写開始部位から約 -200bp まで)、エクソン、エクソン-イントロン境界部の配列すべてをシーケンスした。各種薬物トランスポーターの小腸、腎尿細管での局在、輸送の方向を図示した【図 1】。

② シーケンスは、血液より白血球核内 DNA を抽出した後、目的領域を挟むプライマーを用いて PCR 産物を作成し、精製する

(ExoSAP-IT)。蛍光色素標識塩基を PCR 産物に付加するサイクルシーケンスを行う (BigDye Terminator ver1.1)。サンプルを精製し (Centri-Sep Spin Column)、キャピラリー電気泳動によって測定する (ABI 3130)。

③ 薬物動態値として、排泄を表すものとして腎クリアランス (CLr, mL/min) を、吸収を表すものとして最高血漿中濃度 ( $C_{max}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ) と血漿中濃度時間曲線下面積 ( $AUC_{0-48}$ ,  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ ) を用いた。

【図 1】 ガバペンチンを輸送すると考えられる薬物トランスポーターの小腸、腎尿細管での局在、輸送方向



(2) 日本人健康成人 73 名での上記候補遺伝子多型の頻度解析について、上記 (1) の結果より薬物動態と関係があると考えられた特定の SNP (OCTN1 イントロン 5、LAT2 イントロン 2、MATE1 プロモーター) について、別に日本人健康成人男女の血液試料を用いて頻度解析を行った。

(3) 血液検体から抽出した DNA 試料を用いた遺伝子解析については、北里大学医学部・病院の倫理委員会において承認を受けた。

4. 研究成果

(1) 7 名の被験者 (S1~S7) における各種薬物トランスポーター SNP と遺伝子型解析

【表 1】 OAT3 既知、未知 SNP と遺伝子型

SNP No.	塩基	部位	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Found in this study	C → G	Promoter	GG	GG	GG	GG	GG	CG	CG
	A → C	Promoter	CC	CC	CC	CC	CC	AC	AC
	T → C	Promoter	TC	-	TC	CC	TC	-	-
rs4149179	G → A	Exon 2 5UTR	GA	GA	-	-	GA	GA	GA
rs2276299	T → A	Exon 5 Coding	-	TA	-	-	TA	-	-
rs2187384	G → A	Intron8	-	-	-	GA	GA	-	GA

-: Wild homo

OAT3 に関して、機能変化のある既知の多型の検出はなかった。プロモーター部に3か所、未知の多型を検出した。そのうち、二つは S1 ~5 で変異ホモ体、一つは S4 で変異ホモ体であった【表 1】。

【表 2】 MATE1 既知、未知 SNP と遺伝子型

SNP No.	塩基	部位	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Found in this study	G → T	Promoter	-	-	-	-	-	-	GT
rs2252281	T → C	Promoter Exon 1 5UTR	TC	-	-	-	-	-	TC

【表 3】 MATE2-K 既知 SNP と遺伝子型

SNP No.	塩基	部位	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
rs12943590	G → A	Promoter Exon 1 5UTR	-	AA	-	GA	AA	-	-

-: Wild homo

MATE1 に関して、プロモーター部に、機能低下のある既知の多型をヘテロ体として S1 と S7 に認めた。他に、未知の多型をヘテロ体として S7 に認めた【表 2】。

MATE2-K に関して、プロモーター活性の増加する多型を S2 と S5 に変異ホモ体で認めた【表 3】。

【表 4】 LAT2 既知、未知 SNP と遺伝子型

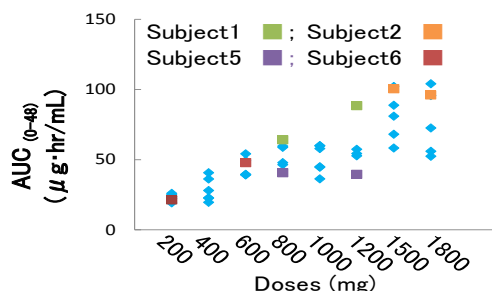
SNP No.	塩基	部位	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
rs11274176		Promoter	del/de	del/de	del/-	del/de	del/-	del/-	del/del
rs8014783	C → A	Promoter	-	-	CA	-	CA	CA	-
	G → A	Promoter	AA	AA	GA	AA	GA	GA	AA
rs7141505	A → C	Promoter	-	-	AC	-	AC	AC	-
Found in this study	G → A	Intron2	AA	AG	AG	AG	-	-	AG
	C → A	Intron2	AA	AC	AC	AC	-	-	AC
	C → T	Intron2	TT	CT	CT	CT	-	-	CT
rs1569951	G → A	Intron6	-	GA	GA	AA	GA	GA	AA
rs1015089	G → T	Intron6	GT	GT	GT	-	GT	-	-
rs6572981	C → T	Intron8	CT	CT	-	-	-	-	-
rs17183863	G → A	Exon10	GA	GA	AA	GA	AA	AA	AA
rs7157021	A → G	Exon10	GG	GG	GG	AG	GG	GG	GG
rs7157207	A → C	Intron9	CC	CC	CC	AC	CC	CC	CC
Found in this study	C → T	Intron9	-	-	-	-	-	CT	-
Found in this study	G → A	Intron9	-	GA	-	-	-	GA	-

del: deletion, -: Wild homo

LAT2 に関して、アミノ酸が変化するような多型は検出されなかった。未知の多型をイントロン 2 において、変異ホモ体として S1 に認めた【表 4】。

(2) ガバペンチンの単回および反復経口投与後の薬物動態パラメーターと腎機能値

【図 2】単回投与後の用量別 AUC 個別値



用量増加に伴い血中濃度の上昇は頭打ちとなる傾向を示し、吸収の飽和が示唆された。吸収においてトランスポーターを介する能動輸送があることと矛盾しない【図 2】。

【表 5】単回投与後の薬物動態、腎機能値

Subjects	1		2		5		6	
Dose (mg)	800	1200	1500	1800	800	1200	200	600
AUC 変化率 (%)	+21	+52	+21	+21	-23	-32	-7	+7
CL <sub>R</sub> (mL/min)	107.5	102.5	82.2	80.6	114.0	104.0	100.0	113.2
CL <sub>R</sub> ratio	1.3	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.0	1.3
eGFR (mL/min)	85.4	110.5	83.4	74.8	109.6	95.7	99.0	87.6

S1 の、腎クリアランス低下を伴わない血中濃度増加より、S1 で吸収増加のあることが示された。高用量投与時がトランスポーター機能をより反映すると考えられた【表 5】。

【表 6】反復投与後の薬物動態、腎機能値

Subjects	3		4		7	
	After single dose	After multiple doses	After single dose	After multiple doses	After single dose	After multiple doses
AUC 変化率 (%)	0	-1.6	-12	-30	+39	+46
CL <sub>R</sub> (mL/min)	109.9	119.1	125.2	136.2	72.6	87.4
CL <sub>R</sub> ratio	1.2	1.3	1.0	1.1	0.8	0.9
eGFR (mL/min)	97.2	111.4	129.9	129.9	98.1	98.1

S7 の、腎クリアランスを伴う血中濃度増加より、S7 で腎排泄低下のあることが示された【表 6】。

以上の結果から、吸収増加と排泄低下に関連する多型として、S1 と S7 に各々認められた LAT2 イントロン 2 と MATE1 プロモーターの SNP を候補多型として選択した。LAT2 イントロン 2 に関しては野生型ホモ体 2 名 (S5, 6) と変異型ホモ体 1 名 (S1) での平均 AUC 変化率は -27.5% vs 36.5%であった。

### (3) 日本人健康成人での候補多型頻度解析

OCTN1 イントロン 5、MATE1 プロモーターの SNP に関しては検出されなかった。LAT2 イントロン 2 の SNP 頻度は野生型アレルが 55.5%、変異型アレルが 44.5%であった。遺伝子型頻度を【表 7】に示す。

**【表 7】LAT2 Intron2 SNP の遺伝子型別頻度**

野生型ホモ	ヘテロ体	変異型ホモ
24 人(33%)	33 人(45%)	16 人(22%)

本研究は、ガバペンチンの血中濃度に影響すると考えられる薬物トランスポーター遺伝子多型について、薬物動態値を持つ個別症例から探索し、小腸吸収の個体差に寄与する可能性のある LAT2 遺伝子多型を同定した。

LAT2 の遺伝子多型に関してはこれまでアミノ酸誘導体で、多発性骨髄腫の治療薬であるメルファランの投与を受けた患者群での報告があるが、薬物動態と副作用の個体差に寄与する遺伝子多型は同定されていない (Kuhne A ら, 2007)。今回検出された多型はエクソン 2-イントロン 2 境界部にあった未知のものであり、集団での頻度は変異型アレル頻度として 44.5%、遺伝子型としても変異型ホモ体として 22%と高いものであった。ガバペンチンの薬物治療において問題となっている副作用や反応不良性に関係する候補遺伝子多型として位置付けて良いと考える。

今後は、今回同定した遺伝子多型について、集団において薬物動態と薬物反応性の個体差に寄与するかを調べる必要がある。

本研究は、「取り込み型」薬物トランスポーターの遺伝子多型が薬物治療あるいは医薬品開発においてゲノムバイオマーカーとしての有用性の確立に展開できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

① Maeda K, Tian Y, Fujita T, Ikeda Y, Kumagai Y, Kondo T, Tanabe K, Nakayama H, Horita S, Kusuhara H, Sugiyama Y. Inhibitory effects of p-aminohippurate and probenecid on the renal clearance of adefovir and benzylpenicillin as probe drugs for organic anion transporter (OAT) 1 and OAT3 in humans. *Eur J Pharm Sci*, 査読有, 59, 2014, 94-103, 10.1016/j.ejps.2014.04.004.

② Imai H, Watanabe M, Fujita T, Watanabe H, Harada K, Moritoyo T; ANTCliPh (Academic Network for Trials in Clinical

Pharmacology) Trial 04 Study Group. Pharmacokinetics of teriparatide after subcutaneous administration to volunteers with renal failure: a pilot study. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 査読有, 52, 2014, 166-174, 10.5414/CP202001.

③ Sugiyama A, Hashimoto H, Nakamura Y, Fujita T, Kumagai Y. QT/QTc study conducted in Japanese adult healthy subjects: a novel xanthine oxidase inhibitor topiroxostat was not associated with QT prolongation. *J Clin Pharmacol*, 査読有, 54, 2014, 446-452, 10.1002/jcph.226.

④ Fujita T, Yasuda S, Kamata M, Kamata Y, Kumagai Y, Majima M. A common polymorphism in the tissue kallikrein gene is associated with increased urinary excretions of calcium and sodium in Japanese volunteers. *J Hum Genet* 査読有, 58, 2013, 758-761, 10.1038/clpt.2011.165.

⑤ 藤田 朋恵, 適切な薬物治療のための治験データの見方 第 I 相試験実施者の立場から. *アプライド・セラピューティクス*, 査読有, 4, 2013, 29-34.

⑥ 藤田 朋恵, 安田 修一, 鎌田 真理子, 熊谷 雄治, 馬嶋 正隆. 健康な日本人における組織カリクレイン遺伝子 hK11 多型解析と表現型に関する検討, *臨床薬理の進歩*, 査読有, 34, 2013, 131-139

⑦ Fujita T, Ishihara K, Yasuda S, Nakamura T, Maeda M, Kobayashi M, Sahashi K, Ikeda Y, Kumagai Y, Majima M. In vivo kinetics of indoxyl sulfate in humans and its renal interaction with angiotensin-converting enzyme inhibitor quinapril in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 査読有, 341, 2012, 626-633, 10.1124/jpet.111.187732.

⑧ Maeda K, Ikeda Y, Fujita T, Yoshida K, Azuma Y, Haruyama Y, Yamane N, Kumagai Y, Sugiyama Y. Identification of the Rate-Determining Process in the Hepatic Clearance of Atorvastatin in a Clinical Cassette Microdosing Study. *Clin Pharmacol Ther*, 査読有, 90, 2011, 575-581, 10.1038/clpt.2011.108.

⑨ Maeda K, Takano J, Ikeda Y, Fujita T, Oyama Y, Nozawa K, Kumagai Y, Sugiyama Y. Nonlinear pharmacokinetics of oral quinidine and verapamil in healthy subjects: a clinical microdosing study. *Clin Pharmacol Ther*, 査読有, 90, 2011, 263-270, 10.1038/clpt.2011.108.

〔学会発表〕(計 4 件)

① 中川 智枝, 藤田 朋恵, 前田 実花, 芳田 貢, 大原 千春, 常田 愛子, 佐々木 善信, 小泉 亮輔, 新井 万理子, 天野 英樹, 黒山 政一, 熊谷 雄治. 健康成人男性の甲

甲状腺機能検査値の変動に関する研究 入院拘束が甲状腺機能検査値に及ぼす影響, 第34回日本臨床薬理学会学術総会, 2013/12/6, 東京.

② 小泉 亮輔, 前田 実花, 脇坂 真美, 森 亜矢子, 野村 今日子, 佐々木 善信, 中川 智枝, 眞野 登喜子, 新井 万理子, 藤田 朋恵, 黒山 政一, 熊谷 雄治. 日本人健康成人ボランティアの治験参加動機と認識に関する研究 調査票を用いての予備的調査, 第34回日本臨床薬理学会学術総会, 2013/12/5, 東京.

③ 中村 裕二, 杉山 篤, 橋本 大哉, 藤田 朋恵, 熊谷 雄治. 新規キサランチンオキシダーゼ阻害剤トピロキソスタットの日本人健康成人におけるQT/QTc評価試験, 第34回日本臨床薬理学会学術総会, 2013/12/4, 東京.

④ 藤田 朋恵, 安田修一, 野村今日子, 萩原久美子, 入戸野和代, 高村雅美, 佐橋邦彦, 小林真美, 丸岡奈穂, 中原いちみ, 熊谷雄治, 馬嶋正隆. 日本人での尿中ナトリウム排泄量の個体差要因としてのカリクレイン遺伝子多型検索. 第32回日本臨床薬理学会年会, 2011/12/3, 浜松.

[その他]

北里大学医学部薬理学ホームページ

<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/pharm/achievement.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 朋恵 (FUJITA, Tomoe)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：20296510

### (2) 研究分担者

馬嶋 正隆 (MAJIMA, Masataka)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70181641