

有機カチオントランスポータのプロモータ解析に基づく
薬物腎排泄の評価・予測系構築

(課題番号：17590119)

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（C））
研究成果報告書

平成19年 3月

研究代表者 奥田 真弘
(三重大学医学部附属病院教授)

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（C））
研究成果報告書

課題番号 17590119

研究課題 有機カチオントランスポータのプロモータ解析に基づく薬物腎排泄の評価・予測系構築

研究組織 研究代表者：奥田真弘（三重大学医学部附属病院教授）
研究分担者：水谷秀樹（三重大学医学部附属病院講師）

交付決定額（配分額）（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	2,600	0	2,600
平成18年度	1,000	0	1,000
総計	3,600	0	3,600

《研究の背景・目的》

腎近位尿細管には塩基性薬物を広く認識する有機カチオントランスポータが発現し、H2 受容体阻害薬、抗不整脈薬、ビグアナイド系血糖降下薬、抗がん剤シスプラチン等、構造の異なる種々の塩基性薬物の尿細管分泌に関与している。OCT2 は近位尿細管の側底膜に発現し、膜ポテンシャル依存的に多様な塩基性薬物の細胞内取り込みを媒介するトランスポータであり、種々の有機カチオントランスポータの中でも最も重要な役割を果たしているものの一つであると考えられている。また、OCT2 タンパクや mRNA の腎発現量には顕著な性差が存在し、側底膜を介したカチオン性薬物の輸送と対応していることや、OCT2 の発現調節に血中テストステロンレベルが関与することを立証している。さらに、高尿酸血症モデルラットにおける OCT2 の腎発現量の低下にも一部、血中テストステロンを介した発現調節機構が関与していることを明らかにした。OCT2 は腎臓に最も豊富に発現する有機カチオントランスポータであることから、OCT2 の腎発現レベルは塩基性薬物の腎排泄能の個体差や個体内変動に影響する重要な因子と考えられるが、これまでその発現制御機構に関する情報はほとんど知られていない。研究代表者らはこれまでに、単離した OCT2 プロモータ領域を用いた検討を行い、血中レベルに対応したテストステロン濃度によって、顕著に OCT2 のプロモータ活性が上昇することを明らかにした。本研究では、OCT2 プロモータ領域の変異コンストラクトやアンドロゲンレセプターの特異的阻害剤を用いた検討を行い、テストステロンによる OCT2 発現調節機構の詳細解析を実施した。

《研究成果》

研究実施計画に基づき有機カチオントランスポータ OCT2 のプロモータ領域を単離後、テストステロンによる OCT2 の転写調節機構の解明を図った。

1. OCT1, 2, 3 のプロモータ領域のクローニング

OCT1 並びに OCT3 のプロモータ領域は rat genomic DNA (Clontech 社) を鋳型として、OCT1 並びに OCT3 上流の塩基配列に特異的なプライマー (OCT1: sense 5'-GGACGCGTCCATGCTCTGCGAACTGAGGT-3', antisense 5'-GGCTCGAGGACTGCCACCAGGGGTTTCAT-3' ; OCT3: sense 5'-GGACGCGTCCCTTTCGAAGCAGAGGGAAAA-3', antisense 5'-GGAGATCTTGCAGGAATAGCCTCCAGTGC-3') を用いて PCR により増幅した。一方、OCT2 のプロモータ領域は Rat Genomic DNA (Clontech 社) を鋳型として翻訳開始部位の約 3kb 上流に相当する 406bp の長さの塩基配列を PCR によって増幅後、³²P 標識したものをスクリーニング用のプローブとして用いた。Rat Genomic Library (Clontech 社) を 3 次スクリーニングまで繰り返すことにより、最終的に 2 種類の陽性クローン (約 20 kbp、約 18 kbp) を得た。約 20 kbp のクローンの塩基配列を解析したところ、翻訳開始部位の上流約 3kb を含み、OCT2 のプロモータ領域、exon 1 及び 2、並びに隣接する intron を 2 種類有することが判明した。

OCT の 5' 上流域に相当する約 3kb の DNA 断片を pGL3-Basic luciferase gene ベクター (Promega 社) に導入しサブクローニングした。OCT1, 2, 3 の切断物は制限酵素処理により得た。ARE (アンドロゲン応答配列) の変異は QuikChangeII Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) を用いて作成した。

2. OCT2 プロモータのテストステロンによる転写促進

得られたプロモータ領域を pGL3 ベクターに挿入後、ラットアンドロゲンレセプター (AR) とともにブタ腎由来の培養上皮細胞 LLC-PK₁ に発現させ、プロモータ活性の測定を行った。その結果、OCT2 のプロモータ活性のみが 1 nM 以上のテストステロンによって促進され、アンドロゲンレセプターの拮抗薬である nilutamide によって有意に抑制された。しかしながら、nilutamide による抑制効果は部分的であり、この原因として nilutamide はアンドロゲンレセプターの部分拮抗薬であることが考えられた。一方、HEK293 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、テストステロンによる促進は認められなかったことから、OCT2 の転写促進には腎上皮細胞に特有の何らかの転写調節因子が関与しているものと考えられた。

3. プロモータ領域の部分切除並びに ARE の変異導入コンストラクトにおける転写活性の解析

OCT2 の転写開始部位から上流約 3,000bp までに 5 カ所のアンドロゲン応答配列 (ARE-1~5, 5' 側より順) が認められた。OCT2 のプロモータ領域を種々の制限酵素を用いて切断し作成したコンストラクトを用いてプロモータ活性を測定したところ、-1,895 位で切断したコンストラクトではテストステロンによる転写促進が部分的に低下し、-819 位で切断したコンストラクトではテストステロンによる転写促進が完全に消失していた。このことから、ARE-1 または (及び) ARE-2、並びに ARE-3 または (及び) ARE-4 がテストステロンによる転写促進に関与することが示唆された。そこで、個々の ARE の塩基配列に変異を導入することにより作成した変異コンストラクトを作成し、プロモータ活性を測定したところ、ARE-1 (-2,975~-2,960 位) および ARE-3 (-1,340~-1,325 位) を変異させたコンストラクトにおいてのみ、テストステロンによる転写活性の亢進が完全に消失していた。これらの結果から、OCT2 のプロモータ領域に存在する 2 種類の ARE (ARE-1 及び ARE-3) はテストステロンによる転写活性の亢進に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

本研究成果から、テストステロンが ARE を介した機構により OCT2 の転写活性を促進することが明らかになった。テストステロンによる OCT2 転写活性の直接的な亢進は、OCT2 の腎発現量の個人差の一因となる可能性が考えられた。これらの成果は、薬物腎排泄の個人差を考慮した薬物投与設計や医薬品開発のために有用な基礎的知見と考えられる。

《研究発表》

(1) 学会誌等

【原 著】

- 1) Asaka, J., Terada, T., Okuda, M., Katsura, T. and Inui, K., Androgen receptor is responsible for rat organic cation transporter 2 gene regulation but not for rOCT1 and rOCT3. *Pharm. Res.* 23(4): 697-704 (2006).
- 2) Iwamoto, T., Kagawa, Y., Naito, Y., Kuzuhara, S. and Okuda, M., Clinical evaluation of plasma free phenytoin measurement and factors influencing its protein binding. *Biopharm. Drug Dispos.* 27(2): 77-84 (2006).
- 3) Okuda, M., Kimura, N. and Inui, K., Interactions of fluoroquinolone antibacterials, DX-619 and levofloxacin, with creatinine transport by renal organic cation transporter hOCT2. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21(5): 432-436 (2006).
- 4) Inoue, M., Terada, T., Okuda, M. and Inui, K., Regulation of human peptide transporter 1 (PEPT1) in gastric cancer cells by anticancer drugs. *Cancer Lett.* 230(1): 72-80 (2005).
- 5) Kimura, N., Masuda, S., Tanihara, Y., Ueo, H., Okuda, M., Katsura, T. and Inui, K., Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 20(5): 379-386 (2005).
- 6) Masuda, S., Goto, M., Okuda, M., Ogura, Y., Oike, F., Kiuchi, T., Tanaka, K. and Inui, K., Initial dosage adjustment for oral administration of tacrolimus using the intestinal MDR1 level in living-donor liver transplant recipients. *Transplant. Proc.* 37(4): 1728-1729 (2005).
- 7) Nishio, N., Katsura, T., Ashida, K., Okuda, M. and Inui, K., Modulation of P-glycoprotein expression in hyperthyroid rat tissues. *Drug Metab. Dispos.* 33(11): 1584-1587 (2005).
- 8) Shimizu, Y., Masuda, S., Nishihara, K., Ji, L., Okuda, M. and Inui, K., Increased protein level of PEPT1 intestinal H⁺-peptide cotransporter upregulates absorption of glycylsarcosine and ceftibuten in 5/6 nephrectomized rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288(4): G664-G670 (2005).

【総 説】

- 1) 岩本卓也, 賀川義之, 奥田真弘, 医療安全に関する薬剤師の貢献 薬物動態学的アプローチによる薬物治療の安全確保への貢献. *薬事* 47(11): 1889-1895 (2006).

(2) 口頭発表

《一般演題》

- 1) 水谷秀樹, 平工雄介, 及川佐枝子, 岩本卓也, 村田真理子, 奥田真弘, 川西正祐, トポイソメラーゼ I 阻害薬イリノテカンによる活性酸素生成を介したアポトーシス誘導機構. 日本薬学会第 127 年会 (富山市) 2007 年 3 月
- 2) 川瀬亮介, 浦野公彦, 岩本卓也, 水谷秀樹, 須藤啓広, 内田淳正, 奥田真弘, 人工関節置換術後の慢性骨髄炎患者におけるバンコマイシン体内動態に関する検討～薬剤充填ハイドロキシアパタイト併用の影響～. 第 16 回日本医療薬学会年会 (金沢市) 2006 年 9 月
- 3) 水谷秀樹, 平工雄介, 及川 (多田) 佐枝子, 村田真理子, 岩本卓也, 賀川義之, 奥田真弘, 川西正祐, 新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 FK228 による過酸化水素生成を介したアポトーシス誘導機構. 日本薬学会第 125 年会 (東京都) 2005 年 3 月.
- 4) 村木優一, 賀川義之, 櫻井洋至, 上本伸二, 中尾 誠, 奥田真弘, 生体肝移植患者における重度胆汁鬱滞・血漿交換時の血漿中ミカファンギンナトリウム濃度の変動. 第 22 回日本 TDM 学会・学術大会 (宜野湾市) 2005 年 5 月.
- 5) 西川政勝, 大橋佳代子, 橋本 陽, 奥田真弘, 小野田幸治, 新保秀人, Off-pump 冠動脈バイパス手術後における血小板凝集機能の解析 アスピリン単独 vs. アスピリン+シロスタゾール併用. 第 46 回日本脈管学会総会 (大阪市) 2005 年 12 月.
- 6) 大橋佳代子, 橋本 陽, 小野田幸治, 西川政勝, 新保秀人, 奥田真弘, Off-pump 冠動脈バイパス手術後における血小板凝集機能の検討. 第 51 回日本薬学会東海支部総会・大会 (岐阜市) 2005 年 7 月.
- 7) 岩本卓也, 平工雄介, 水谷秀樹, 奥田真弘, 川西正祐, 抗がん剤ダカルバジンの光遺伝毒性発現機構の解明. 日本癌学会 (札幌市) 2005 年 9 月.

(3) 出版物

- 1) 奥田真弘, 有機カチオントランスポーターOCTs. 創薬動態－医薬品創製のための考え方と最新情報－. 玉井郁巳, 鈴木洋史, 千葉雅人, 笠井英史. 東京: 日本薬物動態学会 2006, pp146-153.
- 2) 奥田真弘, 薬物血中濃度モニタリング (TDM) ・概論. 「医療薬学 第 4 版」, 乾 賢一, 奥村勝彦編, 廣川書店, p213-218 (2005).

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

な し