

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (薬学)	氏名	小笠原 健
論文題目	腎有機イオントランスポータの転写制御に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>腎臓の近位尿細管上皮細胞に発現する有機イオントランスポータ (SLC22A)は、多様なイオン性薬物の尿細管分泌を媒介している。著者の属する研究室では、これまでに有機イオントランスポータの機能・発現に関する研究を展開し、有機アニオントランスポータOAT1 (SLC22A6)及びOAT3 (SLC22A8)並びに有機カチオントランスポータOCT2 (SLC22A2)が薬物腎排泄において主要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。さらに腎疾患患者において、アニオン性薬物のセフェム系抗生物質セファゾリンの腎排泄速度がOAT3のmRNA発現量と相関することを報告し、薬物トランスポータの発現量と薬物体内動態の個体差が関連していることが示されてきた。近年、転写調節領域の一塩基多型 (regulatory SNP: rSNP) は、遺伝子の発現に影響を及ぼすことが報告されているが、腎有機イオントランスポータ発現量の個体差にrSNPが関与するか否かは不明である。また、腎臓に発現する有機アニオントランスポータについては、mRNA発現量を規定する転写制御機構に関する情報が乏しい。</p> <p>そこで著者は、腎有機イオントランスポータの発現に影響を及ぼすrSNPの探索と、OAT1及びOAT3の転写制御機構の解明を試み、以下の新知見を得た。</p>			
<b>I. 腎有機イオントランスポータの発現に影響を及ぼすrSNPの探索</b>			
<p>腎腫瘍患者63名の正常組織より精製したゲノムDNAを用いて、OAT1-OAT4及びOCT2のrSNPの探索を行った。その結果、OAT1-OAT4の発現量を変化させるrSNPは見出されなかった。一方、OCT2のプロモーター領域に存在する3塩基欠失の変異 (-578_-576delAAG)は、OCT2の転写活性を有意に低下させ、この変異を有する患者群でmRNA発現量の減少傾向が認められた。以上の検討より、OCT2の発現に影響を及ぼす遺伝子多型を見出した。</p>			
<b>II. 腎有機アニオントランスポータの転写制御機構</b>			
<p>OAT1のプロモーター領域をクローニングし、フクロネズミ腎由来OK細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより転写活性を測定した。OAT1の転写活性は、hepatocyte nuclear factor (HNF)-4<math>\alpha</math>を共発現させることにより顕著に促進された。詳細なシスエレメントの探索の結果、HNF-4<math>\alpha</math>のコンセンサス配列であるdirect repeat-2に加え、新規のHNF-4<math>\alpha</math>結合配列inverted repeat (IR)-8がOAT1の転写活性化に関与していることが判明した。さらに、IR-8を介したHNF-4<math>\alpha</math>の転写調節が、OAT1の基礎転写において重要な役割を担うことを明らかにした。</p> <p>OK細胞を用いたOAT3のプロモーター解析により、OAT3の基礎転写に重要なシスエレメント及び転写因子の同定を試みた。プロモーターのdeletion analysisの結果、-214位から-77位の領域にシスエレメントが存在することが示唆された。ゲルシフトアッセイにより、この領域内のcAMP-response element (CRE)にCRE-binding protein</p>			

(CREB)-1及びactivating transcription factor (ATF)-1が結合することが判明した。Protein kinase A (PKA)活性化剤8-Br-cAMPを処理することにより、CREB-1とATF-1のリン酸化を介してOAT3の転写活性が2.5倍上昇した。従って、CREB-1及びATF-1が、OAT3遺伝子の構成的かつPKAによる誘導的な遺伝子発現に関与していることが明らかになった。

以上、著者は腎有機イオントランスポータのrSNP解析を行うことにより、OCT2の発現量を低下させる3塩基欠失の変異を見出した。さらに、OAT1及びOAT3の転写制御機構を解明した。本研究成果は、腎有機イオントランスポータの発現制御機構解明の基盤になるとともに、薬物の治療効果や体内動態の個体差を予測する上で有用な基礎情報を提供するものと考えられる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

腎臓は、肝臓とともに薬物の排泄において重要な役割を果たしている。特に、近位尿細管上皮細胞に発現する有機イオントランスポータは、多様なイオン性薬物の尿細管分泌を媒介し、有機アニオントランスポータOAT1及びOAT3、並びに有機カチオントランスポータOCT2が主要な役割を果たしている。また、申請者の属する研究室では、アニオン性薬物であるセフェム系抗生物質セファゾリンの腎排泄速度が、OAT3 mRNA発現量と相関することを報告し、薬物トランスポータの発現量と薬物体内動態の個体差が密接に関連していることを明らかにしてきた。しかし、薬物トランスポータの発現量を規定する因子や、その転写制御機構については情報が乏しく、その分子機構の解明が求められていた。そこで申請者は、腎有機イオントランスポータ発現量に影響を及ぼすプロモーター領域の一塩基多型 (regulatory SNP: rSNP) の探索を試みるとともに、OAT1及びOAT3の転写制御機構について精査し、以下の新知見を得た。

腎腫瘍患者63名の正常組織より精製したゲノムDNAを用いて、OAT1~4及びOCT2のrSNPの探索を行った。その結果、OAT1~4の発現量を変化させるrSNPは見出されなかったが、OCT2では、転写活性に影響を及ぼす3塩基欠失の変異 (-578\_-576delAAG)が発見された。この変異を有する患者群では、OCT2 mRNA発現量も減少していた。以上の検討より、OCT2の発現に影響を及ぼすプロモーター領域の遺伝子多型が初めて見出された。

OAT1及びOAT3の転写制御機構について、ルシフェラーゼアッセイやゲルシフトアッセイを用いて検討した。その結果、OAT1の基礎転写にはhepatocyte nuclear factor (HNF)-4 $\alpha$ が、またOAT3の基礎転写には、CRE-binding protein (CREB)-1及びactivating transcription factor (ATF)-1が関与していることが明らかになった。さらにOAT3の転写活性は、Protein kinase A (PKA)活性化剤8-Br-cAMPを処理することにより、転写因子のリン酸化を介して促進されることが示された。これらの結果は、OATファミリーのシスエレメントとトランス因子を初めて同定したものである。

以上の研究は、有機イオントランスポータファミリーの発現制御機構について初めて明らかにしたものであり、これまで分子情報の乏しかった腎薬物トランスポータの発現制御機構に新知見をもたらした。これらの研究成果は、医薬品の体内動態の個体差解明に貢献すること大であり、薬物動態学の発展に寄与するところが多い。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成22年2月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降