

(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	梶原 望渡
論文題目	発現調節に着目した有機カチオントランスポータ機能の個体間変動制御因子の解明に関する研究		
（論文内容の要旨） 肝臓及び腎臓におけるカチオン性薬物の局所動態は、血管側膜に発現する膜電位依存性有機カチオントランスポータ（OCT）と、管腔側膜に発現するH⁺/有機カチオンアンチポータ（MATE）によって制御されている。近年、薬物療法の個別化に向けて様々な研究が展開され、薬物トランスポータの遺伝子多型が薬物の体内動態や薬効に影響を及ぼす因子として注目されている。著者が所属する研究室では、薬物トランスポータの発現量も薬物動態の個体間変動を説明しうる分子情報であることを示してきた。一方、OCT1や同定されて間もないMATEトランスポータの機能的差異を説明する分子メカニズムはほとんど未解明であった。そこで著者は、OCT1（SLC22A1）並びにMATE1（SLC47A1）の転写制御機構の解明と、MATEトランスポータの発現及び機能に影響を及ぼす遺伝子多型の同定を試み、以下の新知見を得た。 I. 有機カチオントランスポータの転写制御機構の解明並びにregulatory single nucleotide polymorphism (rSNP) の探索 肝特異的に発現するOCT1のプロモーター領域をdeletion analysisに供した結果、転写開始部位より-141位から-69位の領域において、OCT1の基礎転写に重要な転写因子結合部位（シスエレメント）の存在が示唆された。ゲルシフトアッセイ及びレポーターアッセイを用いた検討から、この領域のE-boxにupstream stimulating factor (USF) 1及びUSF2 が結合し、OCT1の転写活性を促進することを見出した。また、肝臓で多様な遺伝子の発現を制御するhepatocyte nuclear factor (HNF) 4αとUSFの共発現は、OCT1の転写活性を相加的に促進させた。従って、USFがE-boxを介してOCT1の基礎転写を制御することが明らかとなった。 肝臓及び腎臓に発現するMATE1の基礎転写に重要なシスエレメント及び転写因子を同定するため、MATE1のプロモーター解析を行った。その結果、2つのGC-boxを介したspecificity protein (Sp) 1による転写調節は、MATE1の基礎転写において重要な役割を担うことが示された。次に109名の患者の末梢血から抽出したゲノムDNAを用いてMATE1のrSNP探索を行った。Sp1結合領域に検出された-32G>Aは、Sp1の結合量を50%低下させ、患者の腎臓におけるMATE1mRNA発現量の低下と関連することが示唆された。以上の検討より、MATE1の発現量に影響を及ぼすrSNPの同定に成功した。			

II. MATEトランスポータの機能欠損を伴う遺伝子多型の同定

89名の患者より採取したゲノムDNAを用いて、MATE1並びに腎特異的に発現するMATE2-K (SLC47A2) の全17exonにおいて遺伝子多型の探索を行い、MATE1ではV10L、G64D、A310V、D328A、N474Sを、MATE2-KではK64N、G211Vをアミノ酸変異を伴う遺伝子多型として同定した。*In vitro*発現系を用いてテトラエチルアンモニウム (TEA) 輸送能並びに細胞膜表面におけるタンパク質発現を精査した結果、G64D、G211V多型は、MATE1、MATE2-KそれぞれのTEA輸送能を消失させ、その要因は細胞膜表面におけるタンパク質発現の欠如であることが判明した。次に、MATEトランスポータの機能欠損が薬物動態へ及ぼす影響を調べるため、腎排泄型カチオン性薬物であるバレニクリンを用いた検討を行った。培養細胞における取り込み実験により、バレニクリンがMATEトランスポータの基質であることを明らかにした。さらに、*Mate1*ノックアウトマウスにバレニクリンを投与したところ、野生型マウスと比較してバレニクリン血中濃度及び尿中排泄量はそれぞれ有意に上昇、減少した。同時に、*Mate1*ノックアウトマウスにおけるバレニクリンの腎クリアランス及び分泌クリアランスは、野生型マウスの62%、55%に低下していた。従って、MATEトランスポータの機能欠損を引き起こすこれら遺伝子多型を有する患者において、カチオン性薬物の体内貯留とそれに伴う副作用発現の危険性が高まることが示唆された。

以上、著者はOCT1及びMATE1の転写制御機構を分子的に解明し、MATE1については発現量に影響を及ぼすrSNPを見出した。また、MATEトランスポータの機能を欠損させる遺伝子多型を同定し、それらがカチオン性薬物の腎挙動に影響を及ぼすことを強く示唆する結果を得た。本研究成果は、カチオン性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情報を提供するものと考ええる。

(論文審査の結果の要旨)

薬物治療における個人差は、薬物動態学的要因によることが多い。特に、 β 遮断薬や抗糖尿病薬などのカチオン性薬物の解毒を担う薬物トランスポータ分子の個人差は、重篤な副作用発現に繋がることから、医療現場においても注目されている。申請者は、このような臨床上の問題点を解決するために、カチオン性薬物の体内動態を支配する有機カチオントランスポータ群の機能的な個人差が、腎臓や肝臓におけるこれらトランスポータ分子の発現量の一部依存していると想定し、多角的な解析を行い、重要な新知見を得ることが出来た。

カチオン性薬物の肝細胞取り込みを媒介する有機カチオントランスポータOCT1の転写調節を制御するrSNPの探索と、機能的重要性の解明は、抗糖尿病薬であるメトホルミンなどの肝移行の個人差を説明し得るだけでなく、OCT1がUSF1やUSF2という構成的な転写因子に加えてHNF4 α といったホメオボックス遺伝子にも調節を受けるという興味深い現象を見出した。同時に、細胞内からのカチオン性薬物の排出を媒介するMATE1またはMATE2-KのrSNP、cSNPの探索と機能解析は、膜発現量の変化に繋がる貴重な発見をもたらした。さらに、Mate1ノックアウトマウスを用いた検討では、カチオン性薬物バレニクリンの動態特性変化、特に尿中排泄速度低下を明確に示した。これらは、ヒトにおいて見出されたMATE1およびMATE2-KのSNPによる膜発現量の低下がもたらすin vivoの影響を示すものであり、今後MATE遺伝子の多型解析の重要性を強く示唆するものである。

本研究成果は、カチオン性薬物を用いた薬理ゲノミクスに基づく個別化免疫抑制療法確立と医療薬剤学の発展に寄与するところ大である。

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23年2月21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