11S2-01 薬物トランスポーター群の遺伝子多型玉井郁巳^{1,2)}, 崔 吉道^{1,2)}, 根津淳一³⁾, 奥 飛鳥³⁾, 嶋根みゆき³⁾, 小泉昭夫⁴⁾, 辻 彰^{1,2)}¹⁾金沢大・薬、²⁾CREST、³⁾中外分子医学研、⁴⁾京都大・医

GENETIC POLYMORPHISM OF DRUG TRANSPORTERS

Ikumi TAMAI^{1,2)}, Yoshimichi SAI^{1,2)}, Jun-ichi NEZU³⁾, Asuka OKU³⁾, Miyuki SHIMANE³⁾, Akio KOIZUMI⁴⁾, and Akira TSUJI^{1,2)}¹⁾ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, ²⁾ CREST, Japan Science and Technology Corporation, ³⁾ Chugai Research Institute for Molecular Medicine Inc., and ⁴⁾ Kyoto University School of Public Health.

【目的】 薬物の細胞膜透過は吸収・分布・排泄に大きく影響するが、その過程における特異的トランスポーター蛋白の関与が明らかになってきた。薬物動態に関与すると考えられるトランスポーターは多岐にわたり、発現臓器も様々である。また、薬物輸送に働くトランスポーター分子自身は特定の生理的役割を有していると考えられ、薬物分子と生理的物質との相互作用なども考慮する必要がある。特に最近ではヒトにおける薬物トランスポーターの分子の実体の解析が進み、病態や臨床的な薬効・毒性との関連についても解析が可能となりつつある。薬物代謝酵素活性が薬物動態に大きく影響し、その遺伝子多型による活性変動が薬効の維持や毒性発現に多大な影響を与えることが明らかになっている。ヒトにおける薬物トランスポーターの分子論的解析が進行しつつある現在、薬物代謝酵素系と同様に、薬物動態影響因子としてのトランスポーターの遺伝子多型に関する情報は重要である。薬物動態上極めて重要な位置を占めるに至っている P-糖タンパク(MDR1 遺伝子)については、既に数種の遺伝子多型が報告されており、ジゴキシンの消化管吸収への影響も示唆されている^{1,2)}。私たちが弱酸性化合物輸送に機能することを報告してきたモノカルボン酸トランスポーター MCT1 についても遺伝的変異が見いだされ、生理的基質である乳酸の輸送活性変動による病態との関連も報告されている³⁾。しかし、薬物トランスポーターに関する遺伝子多型を解析する上における問題点は phenotype の評価基準である。その指標が明確でないため、MDR1 遺伝子で行われたように多くのボランティアからの試料提供に基づいた無作為的な遺伝子解析に依存しなければならない。一方、薬物輸送にも関わるトランスポーターであっても生理的役割が明確な場合には、本来の基質の動態変動や関連する病態あるいは臨床検査値などから遺伝子多型の存在を推定することは可能である。血中ビリルビン濃度変動によって見いだされた実験動物における cMOAT(MRP2)遺伝子変異はその例となる⁴⁾。

我々は最近、有機カチオン／カルニチントランスポーターとして OCTN トランスポーターを見だし、その機能解析を進めてきた⁵⁾。ヒト OCTN2 遺伝子は chromosome 5q31.1 に位置し、従来の連鎖解析によって同定されていた遺伝性全身性カルニチン欠乏症(SCD)の原因遺伝子座と一致した⁶⁾。また

我々は、遺伝子変異によるカルニチン輸送の低下と SCD 症状が関連することから、OCTN2 が SCD の原因遺伝子であることを実証した⁷⁾。すなわちカルニチンの組織分布や尿中からの再吸収による体内カルニチンの維持は、OCTN2 に大きく依存することが明らかになった。一方、OCTN2 は腎尿細管刷子縁膜などで有機カチオン性物質の分泌に働くことから、薬物動態にも関連することを示した⁸⁾。

そこで本研究では、有機カチオン性薬物の輸送に働き、さらにその生理機能が明確な OCTN2 に着目し、一般ボランティア集団からカルニチン欠乏症状(血中カルニチン濃度減少と尿中カルニチン排泄増大)という phenotype をもとに、その遺伝子多型について解析を行った。

【方法】 インフォームドコンセントを得た被験者集団全員について血中 free カルニチン濃度を測定し、その濃度に応じて以後の被験者を絞り込んだ。第一段階スクリーニングで選別された被験者についてさらに血中 free カルニチン濃度ならびに尿中 free カルニチン濃度の再測定を行い、phenotype を選択し、遺伝子解析を行った。遺伝子解析を行うために、各エクソン(10 エクソン)に対してスプライシング部位も増幅部位に含む PCR プライマーを設計した⁷⁾。続く試験に対するインフォームドコンセントを得た各被験者の血液から得たゲノム DNA を基に、上記プライマーを用いた direct sequencing 法により塩基配列を決定した。また、上記とは独立して、臨床医からの SCD 患者診断の依頼に基づいた OCTN2 遺伝子解析も行った。変異が見いだされた OCTN2 遺伝子は、wild 型 OCTN2 遺伝子を基に in vitro 部位突然変異によって作成し、pcDNA3 発現ベクターコンストラクトを調製した。本コンストラクトを HEK293 細胞へのトランスフェクションし、機能解析を行った。

【結果及び考察】

初期被験者として 973 人(男性 557 人、女性 416 人)を選び、血中 free カルニチン濃度を測定した。平均 free カルニチン濃度(男性 50.4±7.62μM, 女性 40.2±7.19μM)について、cutoff 値として正規分布に基づいた低濃度側 5%領域を異常値(男性 38μM, 女性 28μM)、それ以上が正常値と判断した。異常値を示した被験者(男性 26 人、女性 20 人)からそ

れぞれ 19 人および 17 人について、さらに正常値内の男性 45 人および女性 24 人について、再度血中 free カルニチン濃度ならびに尿中 free カルニチン濃度を測定した。図 1 は男性 64 人、女性 41 人について血中 free カルニチン濃度とクレアチニン濃度で補正した尿中 free カルニチン濃度の関係を示す。両者には有意な相関性が見られたが ($p < 0.01$)、後述する変異を有した被験者については血中濃度とは無関係の尿中濃度を示した。また、cutoff 値を点線で示してある。二度目の血中濃度測定でも男女各 7 人について低値が得られた。また、正常値集団は再測定によってもいずれも正常値範囲内であった。

上述した男性 64 人および女性 41 人について OCTN2 遺伝子解析を行った。その結果、OCTN2 遺伝子変異が男性 2 人、女性 7 人について（うち一人は後述する機能低下が軽度の M179L）、変異 allele が見いだされた。その変異は、W132Stop, M179L, W283C、および S467C、であった。また、後者三種の変異 OCTN2 を HEK 細胞に発現させカルニチン輸送を解析したところ、S467C および W283C ではほぼその活性を消失していた。また、M179L では活性低下の程度はそれほど大きくなかった。このようにカルニチン輸送活性の低下が見られた OCTN2 遺伝子変異を持つ被験者は図 1 にそれぞれ (□、○) で示した。男女とも cutoff 値以下に分布する。従って、血中 free カルニチン濃度を phenotype とした機能低下を伴う OCTN2 遺伝子変異の検出は可能であることが示された。また、初期被験者 973 人から算出される OCTN2 変異 allele の頻度は 1.01% と算出され、遺伝病としては高頻度であることが示唆された。

図 1

我々の解析を含め、現在までに 10 種以上の SCD と関連する OCTN2 遺伝子変異が報告されている。ミスセンス変異を伴う塩基置換については、図 2 に示すように既に機能欠損を伴った形で明らかにされている。特に Arg282 あるいは Trp283 周辺は複数の患者からの変異が見いだされおり hotspot の可能性もある。

図 2 で得られた変異の発見は SCD-phenotype として患者からの場合と、ヘテロで変異 allele を有する場合は本研究成果のように、血中あるいは尿中 free カルニチン濃度値を phenotype として OCTN2 遺伝子多型の推察は可能である。SCD モデル動物である *jvs* マウスにおいては、カルニチンと同様に有機カチオン TEA のクリアランスが低下するという動態上の phenotype を示すことを確認しており⁸⁾、OCTN2 は薬物動態に影響するような遺伝子多型を有するトランスポーターの一つとなる。カルニチン体液濃度からの推察によって機能低下を伴う種々の OCTN2 遺伝子変異が見いだされたが、OCTN2 の場合有機カチオン輸送とカルニチン輸送機構が異なる場合がある。例えば S467C では TEA 輸送活性は低下せず、両者の活性変動が必ずしも一致しない。薬物動態との関連という点で今後の解析を要する。

OCTN2 にとどまらず、我々はヒト有機アニオントランスポーター OATP についても SNPs の存在に関する結果も得ており⁹⁾、多くのヒト薬物トランスポーターの遺伝子多型が見いだされるものと考えられる。その他にもトランスポーター遺伝子の多型は報告されており、それらの薬物動態への影響について今後の解析が必要である。

図 2

【Abstract】 In the present study, we studied the genetic polymorphism in drug transporters, using organic cation/carnitine transporter OCTN2 as a model transporter. Since OCTN2 plays a role in carnitine transport by mediating especially a renal reabsorption of carnitine from urine, free carnitine concentrations in blood and urine were used for phenotyping of the genetic mutation of OCTN2. From general population ($n=973$), the phenotyping resulted in 46 people with significantly low blood free carnitine concentration. Among them 36 people and 69 normal people were further examined for their free carnitine concentration and OCTN2 genes. Only from the group that showed low carnitine blood concentration, three kinds of heterozygous mutations of OCTN2 gene that show functional loss were found. Furthermore, based on the phenotype observed by systemic carnitine deficiency, many type of mutations in OCTN2 were found with functional loss. Accordingly, organic cations that are transported by OCTN2 are suggested to exhibit altered pharmacokinetic behavior in the people who have the heterozygosity. This is the first demonstration of genetic polymorphism in organic cation transporters found in normal population.

【References】 1) *Blood* **91**:1749 (1998). 2) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:3473 (2000). 3) *Muscle Nerve* **23**:90 (2000). 4) *Am. J. Physiol.* **272**:G16 (1997). 5) *J. Biol. Chem.* **273**:20378 (1998). 6) *Am. J. Hum. Genet.* **63**:101 (1998). 7) *Nature Gen.* **21**: 91 (1999). 8) 投稿中. 9) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**: 251 (2000).