定量的標的プロテオミクスによるファーマコプロテオミクスアプローチ

大槻 純 男

Pharmacoproteomic Approach by Quantitative Targeted Proteomics

Sumio Ohtsuki

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University; 6-3 Aoba,
Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan.*

(Received December 2, 2011)

Omics analyses provided many candidates for drug targets and biomarkers. However, these analyses have not contributed to drug development efficiently because of top-down omics analyses. To solve this problem, we have recently developed quantitative targeted proteomics with multiplexed-multiple reaction monitoring (multiplexed-MRM) method, which enables us to perform bottom-up proteomics. In this method, the target proteins for quantification are selected prior to analysis based on the knowledge related to interesting phenomena. Target peptides for quantification are selected only from sequence information, so time-consuming procedures such as antibody preparation and protein purification are unnecessary. In this review, we introduce the technical features of multiplexed-MRM method as novel protein quantification method, and summarize its advantages with reference to recently reported results, including species differences, *in vitro*-to-*in vivo* reconstruction and personalized chemotherapy. This novel simultaneous protein quantification method overcomes problems of antibody-based quantification and would open new drug research based of protein as “Pharmacoproteomics”.

Key words——mass spectrometer; multiple reaction monitoring; pharmacoproteomics; protein; proteomics; quantification

はじめに～トップダウンからボトムアッププロテオミクスへ～

プロテオミクスやゲノミクスなどのオミクス技術は創薬や創薬研究に変革をもたらすと期待されている技術である。これらオミクス技術はゲノム解析で蓄積された配列情報を基に網羅的に分子の発現を解析し、発現に基づいて注目する現象に係わる分子群を提示する。しかし、提示された分子群すべてが創薬ターゲットになるわけではなく、オミクス解析の後には多くの候補分子から真に創薬のターゲットとなる分子を見つけ出す解析が必須となる。この過程が極めて時間のかかる困難な過程であるために、オミクス技術は創薬研究に当初予想していたほど貢献できていない。

一方で、創薬及び創薬研究は生命科学の知識を駆使して遂行される。この際に、これまでに蓄積された知識を有効に活用することが求められる。従来のプロテオミクス解析はこれまでの蓄積された知識とは無関係に候補分子を提示するいわばトップダウン解析である。そこで、従来の知識を有効に活用するプロテオミクス技術の開発が、これまでのプロテオミクス技術の問題点を克服し、創薬と創薬研究を加速することができると考えた。これまでに注目している現象に係わっていると明らかになっている分子とその発現は、有用な創薬ターゲットとなるはずであり、プロテオミクス解析では対象分子としてはまずすことのできない分子である。このようなプロテオミクス解析を可能とするためには、これまでの知識を基盤に計測する分子を決め（標的化）、そして標的分子を確実に定量する技術が必要である。そして、従来のトップダウンプロテオミクスと新しいボトムアッププロテオミクスを有効に活用することによって生命の基本的分子であるタンパク質に基づいた創薬研究（ファーマコプロテオミクス）を実現で

東北大学大学院薬学研究科（〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3）

現所属：熊本大学大学院生命科学研究部（〒862-0973 熊本市大江本町 5-1）

e-mail: sohtsuki@ohtsuki-lab.jp

本総説は、日本薬学会第 131 年会シンポジウム S16 で発表したものを中心に記述したものである。

きるであろう。

本総説では、近年筆者らが開発した multiplexed-multiple reaction monitoring (multiplexed-MRM) 法¹⁾による定量的標的プロテオミクスの技術概要を既存技術との比較とともに紹介し、ファーマコプロテオミクスを目指した最新の研究成果について紹介する。

1. 標的化によるボトムアッププロテオミクス

従来のプロテオミクスは2次元ゲル電気泳動(2D-PAGE)によりタンパク質を分離し、発現量の変化のあったタンパク質スポットを切り出し、質量分析によってタンパク質を同定する方法、そして、タンパク質混合試料をトリプシン消化によってペプチドにし、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)によって分離したペプチドを質量分析で順次決定するショットガン解析、これら2つの手法が主に行われている。従来のプロテオミクスの欠点は感度である。2D-PAGEは感度だけではなく膜タンパク質に適応が困難という問題点を有している。ショットガン解析は、網羅的に試料中のタンパク質を同定する極めて優れた方法である(global proteomics)。しかし、網羅的なため発現量が多いタンパク質が同定されやすく、その結果発現量が低いタンパク質は同定されなくなってしまう(Fig. 1)。その結果、actin, histone, heat-shock protein 等ばかり同定されてしまい、従来の知識から注目していた分子は同定されないということになり易い。また、同定に特化している方法であるため定量解析を行うためには非常に複雑な解析法が必要となる。

以上のような従来のプロテオミクスの問題点を克服する手法が標的化である。標的化とは解析を行う前に計測対象の分子を決定し、標的分子“のみ”を検出することである(Fig. 1)。すなわち、これまでの知識から注目する現象に係わっていると考えられる一連の受容体群や代謝酵素群に絞ってオミクス解析をする手法である。この標的化によっていわばノイズである標的外の分子、特に高発現分子、の影響を排除し、標的分子を高感度で検出することが可能となる。また、この標的分子の検出には薬物定量に用いられている multiple reaction monitoring (MRM) を用いるため、優れた精度での絶対発現量の定量が実現された。この multiplexed-MRM 法の実現は、ボトムアップの実現に加えて、抗体を用いないタン

パク質の検出と定量を実現した。

2. 抗体を用いないタンパク質定量法の実現

抗体はタンパク質を検出するための極めて優れたツールである。しかし、タンパク質科学が抗体に大きく依存しており、抗体の問題点ゆえに進歩が妨げられているという現状がある。抗体の最も重要な問題点は①特異性と②特異的抗体の調製の困難さである。Yeast protein chip を用いた解析で、ある polyclonal 抗体は1700種類の yeast のタンパク質と反応したことが報告されている。²⁾ また、EGFR の ELISA キットはキット会社間で定量値が1000倍も異なっていたことが報告されている。³⁾ Multiplexed-MRM 法では、質量に基づいて標的タンパク質特異的なペプチドを検出、定量することで優れた特異性を有している。すなわち、1アミノ酸の相違や修飾によって質量が変化するために、従来特異的抗体の作成が困難であった SNPs や翻訳後修飾の特異的な検出、定量が容易に可能である。さらに、同じ質量を生じるペプチドが他のタンパク質から生成されるかはデータベース検索で確認することが可能であり、*in silico* ベースで定量系の特異性を確認することが可能である。また、後述するように multiplexed-MRM 法の定量系の確立は *in silico* での定量標的ペプチドの決定とペプチドの合成で完了することができ、標的タンパク質を全く必要とせず約1ヵ月という短期間で特異的な定量系の構築が可能となる。

Table 1 には、multiplexed-MRM 法による定量と抗体を用いた ELISA 法による定量のそれぞれの特徴を示している。Multiplexed-MRM 法は上記で示した以外にも、1回の解析で37分子を同時に定量できる特徴がある。一方で感度に関しては優れた抗体による定量と比較して劣る。また、1検体の解析に約2時間を要するため、多検体の解析が抗体と比較して困難である。

以上のように multiplexed-MRM 法は抗体による定量の問題点を克服し、さらに多分子定量という新

大槻純男

熊本大学大学院生命科学研究部・教授、1996年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了、1996年カリフォルニア大学研究員、1999年東北大学大学院薬学研究科研究員、助手、講師、助教授、准教授を経て、2012年より現職。日本薬学会奨励賞、東京テクノフォーラム21ゴールドメダル等を受賞。

Fig. 1. Comparison of Protein Detection Principles between Global Proteomics (shot-gun analysis) and Targeted Proteomics (multiplexed-MRM)

Table 1. Advantages and Disadvantages of Multiplexed-MRM Quantitative Analysis Compared to Antibody-based Quantification

	LC-MS/MS-based analysis	Antibody-based analysis
Quantification	Direct quantification of peptide	Binding assay using antibody
Method availability	Synthesized target peptide is needed.	Antibodies are essential.
Method development	<ul style="list-style-type: none"> ○ About 1 month for development, including target peptide selection, peptide synthesis and MS optimization. ○ Target peptide is selected from sequence information. 	<ul style="list-style-type: none"> Takes long time for development, including antigen preparation, immunization, and specificity validation. Antigen protein or peptide is necessary.
Specificity	<ul style="list-style-type: none"> ○ High specificity by mass filter, and specificity is confirmed by database. ○ Easy to distinguish modification and mutation by mass. 	<ul style="list-style-type: none"> Depending on antibody, and difficult to validate specificity. Difficult to prepare specific antibodies for modification and mutation in proteins.
Sensitivity	Medium sensitivity (ng/mL)	○ High sensitivity (pg/mL-ng/mL)
Multi-protein assay	○ 37 proteins/1 assay	1 protein/1 assay
Multi-sample assay	1 sample/1 assay	○ 96 or more samples/1 assay

Table was cited from Ohtsuki *et al.* with modifications.¹⁾

しい特徴を備えている。そして、このような特徴を応用することによって、これまで抗体の限界がボトルネックとなっていたタンパク質科学をファーマコプロテオミクス等の新しい展開へ導くことができる技術である。

3. Multiplexed-MRM 法によるタンパク質定量の原理

標的プロテオミクスの実現のため、われわれは従来のプロテオミクスで使用されている質量分析タイプと作動原理が異なり感度と定量性に優れた三連四重極型質量分析計 (Triple Quadrupole) の MRM モードを用いた (Fig. 2)。三連四重極型質量分析計は 3 つの四重極 (Q1, Q2, Q3) を有している。Q1 は特定の質量を持つ親イオンのみを通過させるフィルターであり、Q2 では親イオンを限定的に破

壊させて娘イオンを作る。Q3 は特定の質量を持つ娘イオンを通過させる。親イオンと娘イオンがともに質量フィルターを通過したイオンの数を最終的に検出器で計測し、定量を行う。Q1 と Q3 の 2 回の質量フィルターによって大幅なノイズピークの低下を実現し、非常に S/N 比が高い測定が可能である。MRM モードは質量の大きなタンパク質には適応することができない。そこで、標的タンパク質に特異的なペプチドの測定に MRM を適応することによって、膨大なペプチド中から標的タンパク質由来の定量対象ペプチドを高感度に検出し、さらに定量を実現することができる。

MRM 法を用いたタンパク質定量法の概要を Fig. 3 に示した。標的タンパク質をトリプシンで消化し、そのペプチド断片の中から標的タンパク質に特

Fig. 2. Detection of Target Peptide by Multiple Reaction Monitoring (MRM) Analysis Using a Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometer

The figure was cited from Ohtsuki *et al.* with modifications.¹⁾

Fig. 3. Procedure of Sample Preparation and Quantification by Multiplexed-MRM Analysis

The figure was cited from Ohtsuki *et al.* with modifications.¹⁾

異的であり、かつ強いシグナルを与えるペプチドを定量対象ペプチドとする。生体試料から調製したタンパク質試料を可溶化の後、還元、アルキル化を行いトリプシンによって完全に消化を行い、ペプチド試料を調製する。ペプチド試料に既知量の安定同位体標識ペプチドを添加し、HPLCに接続した三連四重極型質量分析計によって解析を行う。試料中の消化ペプチドはHPLCのC18カラムで分離され、

順次オンラインで質量分析計に導入されMRMモードで解析される。その結果、各MRMチャネルに対応するクロマトグラムが生成され、定量対象ペプチドと内部標準である安定同位体標識ペプチドとのピークエリア比と検量線からペプチド試料中の定量対象ペプチドの絶対量を測定する。

MRMモードは、親イオンと娘イオンの質量フィルターの組み合わせ (MRM transition) を 10 ms

という高速で変更できる。1つのチャンネルでは1つの定量対象ペプチドしか検出できないが、チャンネルを高速に変えることによって、複数のペプチドを同一測定中に検出することが可能となる。定量値の特異性と信頼性の確保のためわれわれは1つの標的タンパク質に対して8つのMRM transitionを使用している。さらに、信頼できるクロマトグラフィを得るための最大MRM transitionは300であるため、最も信頼性の高い定量系において同時に37分子(300/8)の定量が可能である。

4. アミノ酸配列に基づく定量標的ペプチド設計

Multiplexed-MRM法では、トリプシン消化によって生成されるペプチドを定量する。したがって、どのペプチドを定量対象とするかが定量の感度と信頼性に大きく影響する。特に、微量タンパク質の定量には、ペプチドが標的タンパク質に特異的であるだけでなく、LC-MS/MSで高効率にイオン化、断片化、検出される必要がある。われわれは過去に作成したプローブと蓄積されたMS検出感度の情報を基に、データベース上のタンパク質配列のみから

定量に最適なペプチドを選択する *in silico* 選択基準を開発した。この基準には、アミノ酸の数や組成の情報が含まれる。例えば、各臓器で機能的発現が認められているマウストランスポーターを定量するためには、計算上約 500 counts/fmol 以上の高感度なペプチドが必要である。しかし、human serum albumin (HSA) をトリプシン消化して生じた 85 個のペプチド中、500 counts/fmol 以上で検出されたペプチドは、わずか 16% であった。一方、確立した選択基準によって選択された 31 個のペプチドでは、74% のペプチドが 500 counts/fmol を超えていた。その後、さらに選択基準を改良し、27 個のヒトトランスポーターのプローブペプチドを選択すると、すべてのペプチドが 500 counts/fmol 以上で検出された。この *in silico* での定量標的ペプチド選択の実現によって定量 PCR と同様に配列情報のみからタンパク質定量法を構築することが実現された (Fig. 4)。

この *in silico* ペプチド選択によってこれまでにトランスポーターや CYP 等の代謝酵素、受容体を含

Fig. 4. Comparison of Method Development Procedures for Multiplexed-MRM Protein Quantification and Quantitative Real Time RT-PCR

The figure was cited from Ohtsuki *et al.* with modifications.¹⁾

め 400 を超えるタンパク質の定量系を構築している。さらに、これまでに脳毛細血管、肝臓、腎臓、血小板での定量を報告している。⁴⁻¹⁰⁾

5. タンパク質発現量に基づく種差の解明

創薬研究において動物実験で明らかになった現象や機構がヒトにおいてどのようなになっているかを解析、予測することは重要である。これまで、ヒトでは機能解析が困難であるため、網羅的な種差の解析は主に遺伝子発現レベルで行われてきた。しかし、遺伝子発現とタンパク質発現や機能とはかならずしも相関せず、より機能に近いタンパク質レベルでの解析が待たれていた。¹¹⁾ Multiplexed-MRM 法の開発によって初めてタンパク質レベルでの種差の評価が可能となった。

われわれは、血液脳関門を構成する脳毛細血管内皮細胞におけるトランスポーターや受容体、密着結合タンパク質の絶対発現量を計測し、ヒト、サル、マウス間で比較した (Fig. 5)。^{1,4,5,9)} グラフに示す通り、サルのタンパク質発現量はヒトと似ており、一方、ヒトとマウスでは質的、量的に種差が存在することが明らかになった。また、個別分子の発現量で比較すると MDR1 の発現量はヒトとサルで有意な差はなかったが、マウスでは MDR1/mdr1a の発現量がヒトと比較して 2.3 倍高いことが明らかとな

った。MDR1 は脳への薬物の移行を妨げている分子であり、発現量が低下すると基質の薬物が脳に移行し易くなる。実際、PET による解析から MDR1 の基質である [¹⁸F]altanserin や [¹¹C]GR205171 のヒトにおける脳移行性はマウスと比較してそれぞれ 4.5 倍、8.6 倍高いことが報告されている。¹²⁾

マウスでは有機アニオンを輸送する MRP4/ABCC4, OAT3, oatp1a4/oatp2, oatp1c1/oatp14 が検出されている。一方、ヒトでは OAT3, OATP1C1, OATP1A2 (human ortholog of oatp1a4) は検出限界以下であった。MRP4 は発現量を定量できたがマウスと比較して 8.2 倍低い発現量であった。これら有機アニオン輸送はマウスにおいてアニオン系薬物だけではなく神経伝達物質代謝物やコレステロール代謝物の脳からの排出に係わっていることを示している。¹³⁻¹⁵⁾ すなわち、ヒトにおいては異なる輸送系が有機アニオン輸送に係わっている可能性も考えられ、今後の研究が必要である。

6. タンパク質発現量と分子活性に基づく *in vivo* 機能の再構築

前章で述べたように種差をタンパク質レベルで理解した後は、それぞれの分子がヒトにおいて注目する現象にどのくらい寄与しているかを定量的に評価する必要がある。ヒトで分子の機能を見ることは

Fig. 5. Comparison of Absolute Protein Expression Levels of Transporters in Brain Capillaries between Human and Monkey (A), and Human and Mouse (B)

The protein expression levels are taken from our previous reports: human, monkey and mouse.^{4,5,9)} In panel B, mouse abca8a, abca8b and abca9 were compared as possible homologues of human ABCA8. Human OATP-A and OATP-B were compared as possible homologues of mouse oatp-2 at the BBB. The solid line passing through the origin represents the line of identity, and the broken lines represent 3-fold differences. Each point represents mean $\pm$ S.D. The molecules on the horizontal (mouse, monkey) or vertical (human) axis are under the limits of quantification. The figure was cited from Ohtsuki *et al.*¹⁾

特異的なプローブを用いた PET で可能であるが極めて限定的である。そこで、新たな方法論として multiplexed-MRM 法で計測した各分子の絶対発現量とモル当たりの分子活性から *in vivo* の分子の活性を予測できないかと考えた。

本総説ではマウス血液脳関門における GLUT1 によるグルコース輸送の再構築について紹介する。モル当たりの分子活性を求めるには独自に樹立した条件的不死化マウス脳毛細血管内皮細胞 (TM-BBB4) を用い、細胞への 3-*O*-methyl-D-glucose (3-OMG) の取り込み輸送速度を求めた。求めた輸送速度から表面積等のパラメーターを用い脳関門透過速度に変換すると $30.0 \mu\text{L}/(\text{min} \cdot \text{g brain})$ という値を得た。¹⁶⁾ この値は、*in vivo* の脳関門透過速度 ($234 \mu\text{L}/(\text{min} \cdot \text{g brain})$) より小さく、細胞での GLUT1 発現量の低下が原因と考えられる。TM-BBB4 での GLUT1 発現量は、 $2.94 \text{ fmol}/\mu\text{g protein}$ であり、モル当たりの分子活性は、 $10.2 (\mu\text{L}/(\text{min} \cdot \text{g brain})) / (\text{fmol GLUT1}/\mu\text{g protein})$ となる。一方で、脳毛細血管内皮細胞における GLUT1 発現量は $90 \text{ fmol}/\mu\text{g protein}$ であり、脳側と血液側の細胞膜に 3 : 1 で発現していることから、全量の 1/4 である $22.5 \text{ fmol}/\mu\text{g protein}$ が速度を規定している。¹⁷⁾ この量に、分子活性を乗ずることで *in vivo* の輸送速度として $230 \text{ fmol}/\mu\text{g protein}$ が予測される。この速度は、実測値 ($234 \mu\text{L}/(\text{min} \cdot \text{g brain})$) と極めて近い値である。

さらに、この理論を発展させ、われわれは脳関門の重要な機能分子である P-糖タンパク質 (mdr1a) の機能の再構築をマウスを用いて行った。¹⁸⁾ 野生型と mdr1a/1b ノックアウトマウスの brain-to-plasma concentration ratio ($K_{\text{p brain}}$) の比である $K_{\text{p brain ratio}}$ を mdr1a の *in vivo* 機能の指標とした。11 種類の P-糖タンパク質の基質を用いて $K_{\text{p brain ratio}}$ を再構築した結果、すべての化合物について予測値と実測値は 1.6 倍以内で一致した。再構築の詳細は参考文献を参照して頂きたい。¹⁸⁾

この再構築法は原理的にヒトも含めたどのような種にも適応可能である。ただし、モル当たり分子活性は修飾によって変わる可能性も考えられ、今後対応が必要である。Multiplexed-MRM 法はリン酸化等の修飾タンパク質の定量も可能であり、機能している場での修飾と非修飾タンパク質をそれぞれ定量

することによって対応できると考えている。さらに、モル当たりの分子活性を計測する *in vitro* での分子活性と *in vivo* での分子活性が異なる可能性も考えられる。例えば、一部のトランスポーターは細胞膜間のイオン勾配を駆動力としており、*in vitro* と *in vivo* で勾配が異なるため速度が異なる可能性がある。このような場合も積極的に本再構築法を用いることによって *in vivo* の条件に近い *in vitro* の条件を構築することが可能であり、*in vivo* の環境を明らかにする上でも有用な方法論となると考えられる。

7. ボトムアップによる分子標的薬個別化治療への展開

バイオマーカー研究の目的は主に早期発見と個別化治療のバイオマーカーの同定である。従来のプロテオミクスは網羅的な計測からバイオマーカーの候補を提示するに留まっている。ボトムアップから考えた場合、全く異なる戦略が見えてくる。分子標的薬は作用する分子が従来薬と比較して明確である。したがって、分子標的薬が有効な作用を発揮するためには標的の分子が発現していなければならない。つまり、標的分子の発現量が分子標的薬の個別化治療の優れたバイオマーカーとなる可能性がある。

そこで、金沢大学医学研究科との共同研究の下、短期間で再発を繰り返す退形成性髄膜腫における PDGFR, EGFR, HER2, VEGFR, c-Met, IGFR, CD33, CD37, c-kit の発現量を定量したところ、PDGFR β が極めて高い発現をあらわしていることが明らかになった。そこで、倫理審査委員会の承認を得て PDGFR β を阻害する分子標的薬 sunitinib を投与したところ、開始 2 週間後の MRI にて原発巣及び播種巣の内部壊死所見を得た。¹⁹⁾ この結果は、標的分子のタンパク質発現量が分子標的薬の選択に有用な指標であることを示唆している。分子標的薬が一部の患者でのみ劇的な効果を発揮している現状から考えると、分子標的薬の適用はがん組織毎ではなく、がんが発現している分子の発現プロファイルによって行うべきだと考えられる。さらに、標的分子の発現プロファイルによる分子標的薬の選択が可能になれば、様々ながんへの適用の拡大が今よりも素早く容易に行うようになるであろう。

8. おわりに

以上のように multiplexed-MRM 法による新しいタンパク質定量は抗体の問題点を克服し、ボトムアッププロテオミクスによる新しいタンパク質科学の展開を可能とした。本総説では multiplexed-MRM 法による新しい研究展開に絞って紹介したが、本法は従来のオミクス技術と組み合わせることですらに有効に機能する。Multiplexed-MRM 法では、まず定量標的のタンパク質を決定する必要がある。ボトムアップでは従来の知識を基盤として決定するが、もう 1 つの有用な方法はオミクス解析によって定量標的分子を決定する方法である。Multiplexed-MRM 法では約 100 分子の定量が可能であるが、ゲノミクスやプロテオミクスはさらに広い網羅性を有している。したがって、ゲノミクスやプロテオミクスによる網羅的解析によって候補を絞り込み、その候補に対する定量系を multiplexed-MRM で構築し、定量することでバイオマーカーとしての有効性を効率的に検証することができる。本法の有利な点はゲノミクスで同定された分子は遺伝子配列さえあれば定量系を約 1 ヶ月という短期間で構築できる点である。今後、multiplexed-MRM 法が様々な領域で活用され、創薬研究を加速できることを期待している。

謝辞 本研究の一部は新エネルギー・産業技術開発機構 産業技術研究助成事業、内閣府 最先端最先端・次世代研究開発支援プログラムの助成により行われたものであり、ここに感謝の意を表します。

REFERENCES

- Ohtsuki S., Uchida Y., Kubo Y., Terasaki T., *J. Pharm. Sci.*, **100**, 3547–3559 (2011).
- Michaud G. A., Salcius M., Zhou F., Bangham R., Bonin J., Guo H., Snyder M., Predki P. F., Schweitzer B. I., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1509–1512 (2003).
- Baron A. T., Lafky J. M., Suman V. J., Hillman D. W., Buenafe M. C., Boardman C. H., Podratz K. C., Perez E. A., Maihle N. J., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **10**, 1175–1185 (2001).
- Ito K., Uchida Y., Ohtsuki S., Aizawa S., Kawakami H., Katsukura Y., Kamiie J., Terasaki T., *J. Pharm. Sci.*, **100**, 3939–3950 (2011).
- Kamiie J., Ohtsuki S., Iwase R., Ohmine K., Katsukura Y., Yanai K., Sekine Y., Uchida Y., Ito S., Terasaki T., *Pharm. Res.*, **25**, 1469–1483 (2008).
- Kawakami H., Ohtsuki S., Kamiie J., Suzuki T., Abe T., Terasaki T., *J. Pharm. Sci.*, **100**, 341–352 (2011).
- Niessen J., Jedlitschky G., Grube M., Bien S., Schwartz H., Ohtsuki S., Kawakami H., Kamiie J., Oswald S., Starke K., Strobel U., Siegmund W., Roskopf D., Greinacher A., Terasaki T., Kroemer H. K., *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 1129–1137 (2009).
- Niessen J., Jedlitschky G., Grube M., Kawakami H., Kamiie J., Ohtsuki S., Schwartz H., Bien S., Starke K., Ritter C., Strobel U., Greinacher A., Terasaki T., Kroemer H. K., *Pharmacogenet. Genomics*, **20**, 396–400 (2010).
- Uchida Y., Ohtsuki S., Katsukura Y., Ikeda C., Suzuki T., Kamiie J., Terasaki T., *J. Neurochem.*, **117**, 333–345 (2011).
- Shawahna R., Uchida Y., Decleves X., Ohtsuki S., Yousif S., Dauchy S., Jacob A., Chassoux F., Daumas-Duport C., Couraud P. O., Terasaki T., Scherrmann J. M., *Mol. Pharm.*, **8**, 1332–1341 (2011).
- Picotti P., Bodenmiller B., Mueller L. N., Domon B., Aebersold R., *Cell*, **138**, 795–806 (2009).
- Syvanen S., Lindhe O., Palner M., Kornum B. R., Rahman O., Langstrom B., Knudsen G. M., Hammarlund-Udenaes M., *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 635–643 (2009).
- Mori S., Ohtsuki S., Takanaga H., Kikkawa T., Kang Y. S., Terasaki T., *J. Neurochem.*, **90**, 931–941 (2004).
- Mori S., Takanaga H., Ohtsuki S., Deguchi T., Kang Y. S., Hosoya K., Terasaki T., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **23**, 432–440 (2003).
- Ohtsuki S., Ito S., Matsuda A., Hori S., Abe T., Terasaki T., *J. Neurochem.*, **103**, 1430–1438 (2007).
- Terasaki T., Ohtsuki S., Hori S., Takanaga H., Nakashima E., Hosoya K., *Drug Discov. Today*, **8**, 944–954 (2003).
- Pardridge W. M., *Ann. NY Acad. Sci.*, **692**, 126–137 (1993).

-
- 18) Uchida Y., Ohtsuki S., Kamiie J., Terasaki T.,
J. Pharmacol. Exp. Ther., **339**, 579–588
(2011).
 - 19) Yoshikawa A., Nakada M., Ohtsuki S., Haya-
shi Y., Obuchi W., Sato Y., Ikeda C., Wata-
nabe T., Kawahara Y., Hasegawa T., Sabit
H., Kita D., Nakanuma Y., Terasaki T.,
Hamada J. I., *Neuropathol. Appl. Neu-
robiol.*, **38**, 105–110 (2012).