

200/0449

平成14年4月10日

厚生労働大臣 坂口 力 殿

住 所 〒654-0152
神戸市須磨区東落合三丁目2番22号
フリガナ スミノ ヤスヒロ
研究者 氏 名 隅野 靖
(所属機関 武田薬品工業株式会社)

平成13年度厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号) : 日本人の薬物動態に関連する遺伝子の多型及びタンパク質等の機能の解明に関する研究(H12-ゲノム-026)

国庫補助金精算所要額 : 金 50,000,000円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金研究報告書目次 (別添3のとおり)
4. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添4のとおり)
5. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添5のとおり)
6. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添6のとおり)

別紙 1

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要

研究費の名称：厚生科学研究費補助金

研究事業：厚生科学特別研究事業

研究課題名：日本人の薬物動態に関連する遺伝子の多型及びタンパク質等の機能の解明に関する研究（総括研究報告書）

国庫補助金精算所要額：50,000,000 円

研究期間：2000-2002

研究年度：2001

主任研究者：隅野靖弘（武田薬品工業株式会社）

分担研究者：鎌田直之（東京女子医科大学）、石川智久（東京工業大学）

A. 研究目的

・インフォームド・コンセントを含む試料等ドネーションの標準的手法を三省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って確立することにより、日本におけるゲノム・遺伝子解析研究に対するパブリック・アクセプタンスを得る。さらに変異・組換えの少ない安定な試料（DNA、セルライン）を得、本研究に利用するとともに研究資源バンク化を図る。

・薬物トランスポーターは薬物の体内動態において極めて重要な役割を果たしている。例えば、小腸上皮細胞や脳血管内皮細胞に発現したトランスポーターは、経口投与した薬剤のバイオアベイラビリティや中枢神経系への薬物移行に大きく影響を与える。本研究は薬物輸送に関連するトランスポーター遺伝子の包括的な SNP 解析と SNP の機能に及ぼす影響を検証する。

B. 研究方法

1) 試料等ドネーションの標準的手法の研究と検証 (鎌谷、隅野)

試料等を提供いただくための同意・説明文書を作成し、インフォームド・コンセントを得る手続きを確立して、公募により血液試料等の提供者を募集し、採血等を行う。

提供された白血球からDNA調製し、連結不可能匿名化を行う。その後、DNAを理化学研究所に解析のために送付する。また、セルラインをEBウイルスにより作製する。

2) トランスポーター変異型タンパク質の発現、機能解析 (石川、隅野)

薬剤トランスポーター蛋白をコードする全長 cDNA を作製してデステイネーションベクターに組み込み、その後エントリーベクターに導入して、細胞に発現させる。そして各々の薬剤トランスポーターの基質を用いて機能解析を行う。一方 SNP に関しては、トランスポーター遺伝子の SNP 情報に基づいて site-directed mutagenesis を行い、上記の方法で細胞に発現させて機能解析を行い、SNP による影響を分析する。

(倫理面への配慮)

本研究は当初、厚生省の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」を遵守して開始されたが、現在はその後施行された三省による倫理指針に適應して進めている。提供いただいた試料については連結不可能匿名化を行ったが、これはコンピュータプログラムを用いた完全な匿名化手法である。研究経過のファルマ スニップ コンソーシアム(代表:隅野靖弘)および東京女子医科大学の遺伝子解析に関する倫理審査委員会への報告など、注意深く行っている。

C. 結果と考察

1) 試料等ドネーションの標準的手法の研究と検証

- ・三省の倫理指針の施行前は厚生省大臣官房厚生科学課長通知「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」(厚科第 305 号、平成 12 年 4 月 28 日)に沿って研究を行った。三省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」施行以降はこれに従った。
- ・ファルマ スニップ コンソーシアムのホームページを通じてボランティアを募集し、最終的に 1111 人のボランティアの登録、受付を行った。
- ・このうち、1032 人のボランティアより文書によるインフォームドコンセントを得た後に採血、臨床検査、アンケート調査を行った。

- すべての試料について連結不可能匿名化を行い、だれも遺伝子情報と個人情報とを永久に連結できないようにした。
- SNP 頻度解析用の DNA 調製法により、1032 人の DNA を調整し、SNP 頻度解析のために理化学研究所に送付した。
- 1032 人のうち、セルライン作製の同意が得られた提供者についてのみ細胞を凍結した。
- 現在、そのうち数百をセルラインに調製している。
- 以上の経過をファルマ スニップ コンソーシアムおよび東京女子医科大学の遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会に研究経過報告として提出した。また、ファルマ スニップ コンソーシアムでは外部の者による調査を実施し、「本研究におけるインフォームド・コンセントは、ファルマ スニップ コンソーシアムに関して、適正に実施された」および「本研究に関してファルマ スニップ コンソーシアムの管理する個人識別情報について、その保護は適正に行われた」旨がファルマ スニップ コンソーシアム代表に報告された。

本研究はマスコミ等にも紹介されたが、おおむね好意的な論調であった。調整された DNA は、理化学研究所に渡され、現在頻度解析が行われている。本研究によるセルライン化された細胞株は本研究以外のヒトゲノム・遺伝子解析研究にも重要なものになると推測される。なぜならば、例えば疾患関連遺伝子を探索する場合に患者さんの試料は得られても、コントロールとして使用する正常人の試料が大変不足しているからである。セルライン化された試料は公的な資源バンクに寄託する予定であるが、これを利用することにより、ヒトゲノム・遺伝子解析研究が加速されることが大いに期待される。

2) トランスポーター変異型タンパク質の発現、機能解析

- ABC トランスポーターの基質特異性スクリーニング系を構築した。まず、薬物輸送に深く関係するヒト ABCB1(P-糖蛋白質)、ABCC1(MRP1)、ABCC2(cMOAT)、ABCG2(BCRP)の cDNA をクローニングし、バキュロウイルス・ベクターを用いて Sf9 昆虫細胞に発現させた。細胞膜に発現した ABC トランスポーターは、特異的抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した。
- それら ABC トランスポーターの基質特異性に関しては、96 穴マルチプレートを用いて ATPase 活性を測定するシステムを構築した。この方法により、大量の化合物を短時間でスクリーニングする事が可能になった。
- ABCG2 については少なくとも 3 種類の遺伝子多型が報告されており、482

番目のアミノ酸が Arg、Gly、Thr である。それら全ての cDNA を準備して、Sf9 昆虫細胞に発現させている。Arg482 型の ABCG2 は Sf9 昆虫細胞にさせて、既に ATPase 活性のスクリーニングで基質特異性を検討した。

- ・さらに新規のヒト ABC トランスポーターである ABCC11 と ABCC12 の cDNA のクローニングに成功した。ABCC11 と ABCC12 はそれぞれ 30 個および 29 個のエクソンからなり、この 2 つの ABC トランスポーターはヒト染色体 16q12 に局在し、約 20kb を隔てて直列に並んでいることが判明した。また、ABCC11 には 2 個のスプライスバリエント、ABCC12 には合計 5 個のスプライスバリエントがあることが明らかになった。現在これら全ての cDNA を昆虫細胞に発現させて機能解析を行っているところである。

薬物輸送トランスポーターは近年特に注目されているが、遺伝子多型については不明な点が多い。薬剤応答性に関連するトランスポーター遺伝子とその機能的多型を解明することは、薬の効果および副作用の関連を解明する上で重要である。本研究は、まさにその点に焦点を絞った研究であり、世界的にもユニークである。日本の知的財産を確実にするためにも、今後研究のスピードアップとインフラの強化が必要であろう。そのため、国内のトランスポーター研究者と薬物トランスポーターの SNP 機能解析に関する準備会議を行った。現在、共同研究の具体的な内容について、話し合いが進行しており、SNP 機能解析の体制が整いつつあると考える。

E. 結論

三省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って 1032 人のボランティアから試料等を提供いただき、連結不可能匿名化を行った後、DNA 調整を実施した。現在セルラインを作製中である。

ABC トランスポーターの基質特異性スクリーニング系を構築した。これにより、機能解析を迅速に行うことが出来ると考えられる。今後、他の薬物トランスポーターについても同様に行う予定であり、トランスポーターの遺伝子多型と機能、薬物動態との関連を解明する国内における研究基盤ができた。

別紙2

厚生科学研究費補助金

厚生科学特別研究事業

**日本人の薬物動態に関連する遺伝子の多型及び
タンパク質等の機能の解明に関する研究**

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 隅野靖弘

平成14(2002)年4月

別紙3

目 次

I. 総括研究報告

日本人の薬物動態に関連する遺伝子の多型及びタンパク質等の機能の解明・・・1
に関する研究
隅野靖弘

II. 分担研究報告

1. 試料等ドネーションの標準的手法の研究と検証・・・4
鎌谷直之

2. トランスポーター変異型タンパク質の発現、機能解析・・・6
石川智久

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・8

別紙 4

1. 総括研究報告

日本人の薬物動態に関連する遺伝子の多型及びタンパク質等の機能の解明に関する研究
隅野靖弘

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）
（総括研究報告書）

日本人の薬物動態に関連する遺伝子の多型及びタンパク質等の機能の解明に関する研究

主任研究者 隅野靖弘 武田薬品工業株式会社 取締役 医薬研究本部長

研究要旨

試料等ドネーションの標準的手法の研究と検証及び薬物動態関連酵素等の変異型タンパク質の発現・機能解析を行う。本研究は、「日本人の薬物動態関連遺伝子多型に関する研究(約180の薬物動態関連遺伝子の新規SNPの同定と試料等ドネーションから得られた約1000人の頻度解析及びCYP3A4等の薬物代謝酵素の発現・機能解析)」の一部として実施し、薬剤応答性に関する共通基盤データを構築するものである。

分担研究者

鎌谷 直之	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター	所長・教授
石川 智久	東京工業大学大学院生命理工学研究科	教授

A. 研究目的

・インフォームド・コンセントを含む試料等ドネーションの標準的手法を三省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って確立することにより、日本におけるゲノム・遺伝子解析研究に対するパブリック・アクセプタンスを得る。さらに変異・組換えの少ない安定な試料（DNA、セルライン）を得、本研究に利用するとともに研究資源バンク化を図る。

・薬物トランスポーターは薬物の体内動態において極めて重要な役割を果たしている。例えば、小腸上皮細胞や脳血管内皮細胞に発現したトランスポーターは、経口投与した薬剤のバイオアベイラビリティや中枢神経系への薬物移行に大きく影響を与える。本研究は薬物輸送に関連するトランスポーター遺伝子の包括的なSNP解析とSNPの機能に及ぼす影響を検証する。

B. 研究方法

1) 試料等ドネーションの標準的手法の研究と検証（鎌谷、隅野）

試料等を提供いただくための同意・説明文書を作成し、インフォームド・コンセントを得る手続きを確立して、公募により血液試料等提供者を募集し、採血等を行う（平成12年度）。提供された白血球からDNA調製を終了し、連結不可能匿名化を行った。その後、DNAを理化学研究所に頻度解析のために送付する。また、セルラインをEBウイルスにより作製する。

2) トランスポーター変異型タンパク質の発現、機能解析 (石川、隅野)

薬剤トランスポーター蛋白をコードする全長cDNAを作製してデステイネーションベクターに組み込み、その後エントリーベクターに導入して、細胞に発現させる。そして各々の薬剤トランスポーターの基質を用いて機能解析を行う。一方SNPに関しては、トランスポーター遺伝子のSNP情報に基づいてsite-directed mutagenesisを行い、上記の方法で細胞に発現させて機能解析を行い、SNPによる影響を分析する。

(倫理面への配慮)

前年度は厚生省の指針に従ったが、今年度は三省による倫理指針に従った。提供いただいた試料については連結不可能匿名化を行ったが、これはコンピュータプログラムを用いた完全な匿名化手法である。倫理面ではファルマ スニップ コンソーシアムでの外部の者による調査の実施と報告、並びに研究経過のファルマ スニップ コンソーシアムおよび東京女子医科大学の遺伝子解析に関する倫理審査委員会への報告など、注意深く行っている。

C. 結果

1) 試料等ドネーションの標準的手法の研究と検証

- 三省の倫理指針の施行前は厚生省大臣官房厚生科学課長通知「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」(厚科第305号、平成12年4月28日)に沿って研究を行った。三省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」施行以降はこれに従った。
- ファルマ スニップ コンソーシアムのホームページを通じてボランティアを募集し、最終的に1111人のボランティアの登録、受付を行った。
- このうち、1032人のボランティアより文書によるインフォームドコンセントを得た後に採血、臨床検査、アンケート調査を行った。
- すべての試料について連結不可能匿名化を行い、だれも遺伝子情報と個人情報を永久に連結できないようにした。
- SNP頻度解析用のDNA調製法により、1032人のDNAを調整し、SNP頻度解析のために理化学研究所に送付した。
- 1032人のうち、セルライン作製の同意が得られた提供者についてのみ細胞を凍結した。
- 現在、そのうち数百をセルラインに調製している。
- 以上の経過をファルマ スニップ コンソーシアムおよび東京女子医科大学の遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会に研究経過報告として提出した。また、ファルマ スニップ コンソーシアムでは外部の者による調査を実施し、「本研究におけるインフォームド・コンセントは、ファルマ スニップ コンソーシアムに関して、適正に実施された」および「本研究に関してファルマ スニップ コンソーシアムの管理する個人識別情報について、その保護は適正に行われた」旨がファルマ スニップ コンソーシアム代表に報告した。

2) トランスポーター変異型タンパク質の発現、機能解析

- ABCトランスポーターの基質特異性スクリーニング系を構築した。まず、薬物輸送に深く関係するヒトABCB1 (P-糖蛋白質)、ABCC1 (MRP1)、ABCC2 (cMOAT)、ABCG2 (BCRP)のcDNAをクローニングし、バキュロウイルス・ベクターを用いてSf9昆虫細胞に発現させた。細胞膜に発現したABCトランスポーターは、特異的抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した。
- それらABCトランスポーターの基質特異性に関しては、96穴マルチプレートを用いてATPase活性を測定するシステムを構築した。この方法により、大量の化合物を短時間でスクリーニングする事が可能になった。
- ABCG2については少なくとも3種類の遺伝子多型が報告されており、482番目のアミノ酸がArg、Gly、Thrである。それら全てのcDNAを準備して、Sf9昆虫細胞に発現させている。Arg482型のABCG2はSf9昆虫細胞にさせて、既にATPase活性のスクリーニングで基質特異性を検討した。
- さらに新規のヒトABCトランスポーターであるABCC11とABCC12のcDNAのクローニングに成功した。ABCC11とABCC12はそれぞれ30個および29個のエクソンからなり、この2つのABCトランスポーターはヒト染色体16q12に局在し、約20kbを隔てて直列に並んでいることがわかった。また、ABCC11に

は2個のスプライスバリエント、ABCC12には合計5個のスプライスバリエントがあることが明らかになった。現在これら全てのcDNAを昆虫細胞に発現させて機能解析を行っているところである。

D. 考察

本研究は当初、厚生省の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」を遵守して開始されたが、現在は、その後施行された三省による倫理指針に適応して進められている。

本研究はマスコミ等にも紹介されたが、おおむね好意的な論調であった。

調整されたDNAは、理化学研究所に渡され、現在頻度解析が行われている。

本研究によるセルライン化された細胞株は本研究以外のヒトゲノム・遺伝子解析研究にも重要なものになると推測される。なぜならば、例えば疾患関連遺伝子を探索する場合に患者さんの試料は得られても、コントロールとして使用する正常人の試料が大変不足しているからである。セルライン化された試料は公的な資源バンクに寄託する予定であるが、これを利用することにより、ヒトゲノム・遺伝子解析研究が加速されることが大いに期待される。

薬物輸送トランスポーターは近年特に注目されているが、遺伝子多型については不明な点が多い。薬剤応答性に関連するトランスポーター遺伝子とその機能的多型を解明することは、薬の効果および副作用の関連を解明する上で重要である。本研究は、その点に焦点を絞った世界的にもユニーク研究である。日本の知的財産を確実にするためにも、今後研究のスピードアップとインフラの強化が必要であろう。そのため、国内のトランスポーター研究者の協力が必要であり、乾教授（京大）、桑野教授（九州大学）、和田教授（九州大学）、辻教授（金沢大学）、遠藤教授（杏林大学）と薬物トランスポーターのSNP機能解析準備会議を行った。現在、共同研究の具体的な内容について、話し合いが進行しており、SNP機能解析の体制が整いつつあると考える。

E. 結論

三省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って1032人のボランティアから試料等を提供いただき、連結不可能匿名化を行った後、DNA調整を実施した。現在セルラインを作製中である。

ABCトランスポーターの基質特異性スクリーニング系を構築した。これにより、機能解析を迅速に行うことが出来ると考えられる。今後、他の薬物トランスポーターについても同様に行う予定であり、トランスポーターの遺伝子多型と機能、薬物動態との関連を解明する国内における研究基盤の整備ができた。

F. 健康危険情報

特記すべき事項はない。

II. 分担研究報告

1. 試料等ドネーションの標準的手法の研究と検証

鎌谷直之

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）
（分担研究報告書）

日本人の薬物動態に関連する遺伝子の多型及びタンパク質等の機能の解明に関する研究

分担研究者 鎌谷 直之 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター所長（教授）

研究要旨

研究のためのヒト良質の試料を倫理的ガイドラインに準拠して採取し、調製し、善意の研究者に配布する作業の重要性はますます高まっている。本研究では日本人のボランティア1000人以上より倫理基準に準拠し試料等を提供いただき、背景データの整理、DNAの調整、セルラインの作成を行う。本年度は1000人以上より既に試料とデータの収集を終了、DNA調整も終了し、連結不可能匿名化を行った後、すべて理化学研究所に送付した。現在、凍結させた細胞をセルラインにする作業を東京女子医科大学で継続中であり、着々とその数は増えている（数百を超えている）。東京女子医科大学の遺伝子解析に関する倫理審査委員会により本計画が承認された後、現在までの研究の進行状況を委員会に報告した。

A. 研究目的

インフォームド・コンセントを含む試料等ドネーションの標準的手法を三省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（昨年度は厚生省の指針に従ったが、今年度は三省の倫理指針に従った）に従って確立することにより、日本におけるゲノム・遺伝子解析研究に対するパブリック・アクセプタンスを得る。さらに変異・組換えの少ない安定な試料（DNA、セルライン）を得、本研究に利用するとともに研究資源バンク化を図る。

B. 研究方法

提供された白血球からDNA調製を終了し、連結不可能匿名化を行った。その後、DNAを理化学研究所に解析のために送付した。現在、セルラインをEBウイルスにより作成している。

（倫理面への配慮）

前年度は厚生省の指針に従ったが、今年度は三省による倫理指針に従った。提供いただいた試料については連結不可能匿名化を行ったが、これはプログラムを用いた完全な匿名化手法である。倫理問題は引き続き、研究経過の東京女子医科大学の遺伝子解析に関する倫理審査委員

会への報告などの面で注意深く行っている。

C. 研究結果

- ・三省の倫理指針の施行前は厚生省大臣官房厚生科学課長通知「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」（厚科第305号、平成12年4月28日）に沿って研究を行った。施行以降は参照の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究ガイドライン」に従った。
- ・1000人以上のボランティアより採血、臨床検査、アンケート調査を行った。
- ・すべての試料を連結不可能匿名化を行い、だれも遺伝子情報と個人情報とを永久に連結できないようにした。
- ・SNP頻度解析に用いるDNA調製法を行い、1000人以上のDNAを調製しすべて連結不可能匿名化を行った後、理化学研究所に送付した。
- ・1000人以上のうち、セルライン作成の同意が得られた提供者についてのみ細胞を凍結した。
- ・現在、そのうち数百をセルラインに調製している。
- ・以上の経過を東京女子医科大学の遺伝子解析

研究に関する倫理審査委員会に研究経過報告として提出した。

D. 考察

本研究は最初、厚生省の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」に沿った形で実施されたが、現在は三省による倫理指針に沿っている。基本的には大きな違いはないと認識している。本研究は新聞にも紹介されたが、おおむね好意的な論調であった。DNA調整は順調で、理化学研究所での解析も順調であるとの報告を受けている。本研究によるDNA、セルラインは今後の日本のバイオ研究の上で非常に重要になるであろう。なぜなら、多くの研究で正常対象が必要になってくるが、実際問題として倫理基準に沿って正常対象を収集する事は困難だからである。このように、情報が整理され、しかも倫理基準を厳密に満たした試料が得られる事は今後のバイオ研究にとって大きな財産となる。

E. 結論

三省による、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って1000人以上のボランティアのサンプル収集を終了し、連結不可能匿名化を終わり、DNA調製を終了した。現在セルラインを作成中である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

2. トランスポーター変異型タンパク質の発現、機能解析

石川智久

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）
（分担研究報告書）

日本人の薬物動態に関連する遺伝子の多型及びタンパク質等の機能の解明に関する研究

分担研究者 石川智久 東京工業大学 大学院生命理工学研究科 教授

研究要旨

本研究は薬物輸送に関連するトランスポーター遺伝子の包括的なSNP解析（シークエンスマップと頻度解析）とSNPの機能に及ぼす影響を検証することを目標としている。そのために、本年度我々はABCトランスポーター遺伝子のcDNAを作成して、それを発現ベクターに組み込んで細胞株に発現させるための基盤を構築した。

A. 研究目的

薬物トランスポーターは薬物の体内動態において極めて重要な役割を果たしている。例えば、小腸上皮細胞や脳血管内皮細胞に発現したトランスポーター蛋白は、経口投与した薬剤のバイオアベイラビリティや中枢神経系への薬剤移行に大きく影響を与える。本分担研究の目的は、薬物輸送に関連するトランスポーター遺伝子の包括的なSNP解析とSNPの機能に及ぼす影響を検証することである。

B. 研究方法

薬剤トランスポーター蛋白をコードする全長cDNAを作成してデステイネーションベクターに組み込み、その後エンターベクターに導入して、細胞に発現させる。そして各々の薬剤トランスポーターの基質を用いて機能解析を行う。一方SNPに関しては、トランスポーター遺伝子のSNP情報に基づいてsite-directed mutagenesisを行い、上記の方法で細胞に発現させて機能解析を行い、SNPによる影響を分析する。

C. 研究結果

今年度、石川の研究グループは、ABCトランスポーターの基質特異性スクリーニング系を構築した。まず、薬物輸送に深く関係するヒトABCB1 (P-糖蛋白質)、ABCC1 (MRP1)、ABCC2 (cMOAT)、ABCG2 (BCRP) のcDNAをクローニングし、バキュロウイルス・ベクターを用いてSf9昆虫細胞に発現させた。細胞膜に発現したABCトランスポーター

は、特異的抗体をもちいたウェスタンブロットにより確認した。

それらABCトランスポーターの基質特異性に関しては、96穴マルチプレートを用いてATPase活性を測定するシステムを構築した。この方法により、大量の化合物を短時間でスクリーニングする事が可能になった。

ABCG2については少なくとも3種類の遺伝子多型が報告されており、482番目のアミノ酸がArg, Gly, Thrである。それら全てのcDNAを準備して、Sf9昆虫細胞に発現させている。Arg482型のABCG2はSf9昆虫細胞にさせて、既にATPase活性のスクリーニングで基質特異性を検討した。

さらに新規のヒトABCトランスポーターであるABCC11とABCC12のcDNAのクローニングに成功した。ABCC11とABCC12はそれぞれ30個および29個のエクソンからなり、この2つのABCトランスポーターはヒト染色体16q12に局在し、約20kbを隔てて直列に並んでいることがわかった。また、ABCC11には2個のスプライスバリエント、ABCC12には合計5個のスプライスバリエントがあることが明らかになった。現在これら全てのcDNAを昆虫細胞に発現させて機能解析を行っているところである。

D. 考察

薬剤輸送トランスポーターは近年特に注目されているが、遺伝子多型については不明な点が多い。薬剤応答性に関連するトランスポーター遺伝子とその機能的多型を解明することは、薬の効果／副作用の関連を解明する上で重要である。本分担当研究は、まさにその点にフォーカスを絞った研究であり、世界的にもユニークである。日本の知的財産を確実にするためにも、今後研究のスピードアップ化とインフラの強化が必要であろう。そのため、国内のトランスポーター研究者の協力が必要であり、乾教授（京大）、桑野教授、和田教授（九州大学）、辻教授（金沢大学）遠藤教授（杏林大学）を薬物トランスポーターのSNP機能解析プロジェクトに招待し準備会議をもった。現在、秘密保持契約と共同研究の具体的内容について、話し合いが進行しており、SNP機能解析の体制が整いつつある。

E. 結論

薬物輸送ABCトランスポーター遺伝子のcDNAを細胞株に発現させ、スクリーニングをするための基盤を構築した。今後SNPを含むcDNAを発現させて機能解析を迅速に行うことが出来ると考えられる。今後他の薬剤トランスポーターについても同様に行う予定であり、トランスポーターの遺伝子多型と機能、薬物動態との関連を解明する国内における研究基盤ができた。

F. 健康危険情報

特記すべき事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoshikawa, M., Yabuuchi, H., Kuroiwa, A., Ikegami, Y., Sai, Y., Tamai, I., Tsuji, A., Matsuda, Y., Yoshida, H., and **Ishikawa, T.** Molecular and cytogenetic characterization of the mouse ATP-binding cassette transporter *abcg4*. *Gene*, in press, 2002

Yoshikawa, M., Kasamatsu, S., Yasunaga, M., Wang, G., Ikegami, Y., Yoshida, H., Tarui, S., Yabuuchi, H. and **Ishikawa, T.** Dose ABCG2 Need a

Heterodimer Partner? Expression and Functional Evaluation of ABCG2 (Arg 482). *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, in press, 2002

Yabuuchi, H., Shimizu, H., Takayanagi, S. and **Ishikawa, T.** Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288, 933-939, 2001

2. 学会発表

Ishikawa, T. A New challenge in the post-genome era: Transport mechanism-based drug design strategy. *Bio Asia Pacific Conference*, Honolulu, Hawaii, USA, 2001

Ishikawa, T., DNA chip technology for transport mechanism-base molecular drug design: a new approach to circumvent multi-drug resistance in the clinical practice of cancer chemotherapy *Pharmacy and Pharmaceutical World Congress 2001*, Singapore, 2001

Ishikawa, T. Human ABC Transporters: From biological function to drug molecular design. *Research Based Oncology*, London, U.K., 2001.

Ishikawa, T. ABC transporters: functional genomics and toxicogenomics in drug discovery. *Toxicogenomics International Forum*, Tokyo, Japan, 2001.

Ishikawa, T. A new challenge in the post-genome era: Transport mechanism-based drug design strategy. *The 9th International Conference: Peace through Mind/Brain Science*, Hamamatsu, Japan, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事項はない

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshikawa, M., Yabuuchi, H., Kuroiwa, A., Ikegami, Y., Sai, Y., Tamai, I., Tsuji, A., Matsuda, Y., Yoshida, H., and Ishikawa, T.	Molecular and cytogenetic characterization of the mouse ATP-binding cassette transporter abcg4.	Gene		in press	2002
Yoshikawa, M., Kasamatsu, S., Yasunaga, M., Wang, G., Ikegami, Y., Yoshida, H., Tarui, S., Yabuuchi, H. and Ishikawa, T.	Dose ABCG2 Need a Heterodimer Partner? Expression and Functional Evaluation of ABCG2 (Arg 482).	Drug Metabolism and Pharmacokinetics,		in press	2002
Yabuuchi, H., Shimizu, H., Takayanagi, S. and Ishikawa, T.	Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12	Biochem. Biophys. Res. Commun	288	933-939	2001
Stock, J.L., Shinjo, K., Burkhardt, J., Roach, M., Taniguchi, K., Ishikawa, T. , Audoly, L	Prostaglandin E ₂ EP1 receptor-deficient mice have altered nociceptive pain responses and reduced blood pressure.	J. Clin. Invest	107	325-31	2001