

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 隅野 靖弘

平成15(2003)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  
に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1  
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・・・・・・・・・・・・・・ 5  
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・・・・・・・・・・・・ 8  
石川智久

III 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12

別紙 4

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に関する研究  
隅野靖弘

厚生労働科学研究費補助金（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 製品戦略部長

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

・日本人の標準的な人たちの細胞と遺伝子の試料を倫理問題に十分配慮した体制で調製し、研究者が利用できるようにすることと、それを用いて薬物動態に関連する遺伝子の多型の頻度解析を行うことである。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り、日本でヒト組織を有益に用いるための環境を整えることも大きな目的とした。薬剤応答性に関連する遺伝子を解明し、最適な薬物療法の実現等を推進すること、即ち薬が効く患者と効かない患者の遺伝子の塩基配列を比較することにより、遺伝子多型と薬の効果・副作用との関連を解明する。特に、薬物輸送に係るトランスポーターの発現系の構築、および基質特異性測定用スクリーニング系を構築する。そして、アミノ酸が変異するSNPを持つ薬物

トランスポーターの機能解析を行い、薬物動態に影響すると予想されるSNPを同定するとともに、SNPによって影響を受ける薬物を発見する。

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）

ホームページを作成してボランティアを募り、東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センターで採血を行い、性別、年齢などの個人非識別情報を収集した後、セルライン作成のために単核球を凍結する。凍結した細胞は、少しずつ融解し、EBウイルスによるセルライン化を行った。作成したセルラインは順次公的バンクに寄託することにより、多くの研究者に貴重な試料として有益に使われ、将来の薬剤開発や日本人の健康維持に貢献する。

## 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)

ヒトABCトランスポーター遺伝子、ABCB1, ABCC1, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCG2の完全長cDNAをクローニングした。そして次に、site-directed mutagenesis法によりABCB1およびABCG2 cDNAにSNPを導入した。そのcDNAを哺乳類細胞または昆虫細胞に発現させるにはpcDNA3.1ベクターを用い、Sf9昆虫細胞に発現させるにはpFastBacベクターを用いた。後者の場合、ベクターから発現用バキュロウイルスを作成した後、昆虫細胞にウイルスを感染させてトランスポーターのタンパク質を発現させた。タンパク質の発現は特異的抗体をもちいたウエスタンブロットで確認した。また、pcDNA3.1ベクターを用いてトランスポーターを発現させる場合は、形質転換した哺乳類細胞 (例えばHRK293細胞) のサブクローニングを行い、安定発現細胞を得た。薬物輸送能を細胞レベルで観測する一方、動力学的解析は基質認識能、ATPase活性 (ABCB1, ABCG2等)、膜ベジクル系 (ABCG2等) での輸送測定によって行った。

### (倫理面への配慮)

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」と、PSCの倫理審査委員会の承認を得る。研究計画に変更があった場合には、直ちに倫理審査委員会に計画の修正を申請し、許可を得た後に実行する。

試料はすべて連結不可能匿名化を行う。即ち、来院時の個人票の名前など、個人識別可能なものについては直ちに紙の部分を取り離し、番号にする。また、それらの番号を100個程度集まった段階で、再度、匿名化する。対応表は作らない。以上のような二段階匿名化を行った。

インフォームドコンセントについても、用紙を含めて倫理審査委員会の承認を受けたものを用いた。インフォームドコンセントは、本計画に使用するための許可、今後の他の遺伝子研究に用いるための許可、セルライン化のための許可を別個に取得した。それを厳密に適用して研究を推進した。例えば、セルライン化の許可が得られなかった試料等については、セルライン化しなかった。

薬物トランスポーター遺伝子のSNP機能解析研究においては、健常人または患者由来の血液、組織サンプルを用いたヒト遺伝子解析研究を一切行わず、市販のcDNAパネルを使用

するのでヒト遺伝子倫理規定に反しない。ヒトABCトランスポーター遺伝子の哺乳類細胞およびSf9昆虫細胞における発現実験については、東京工業大学組み換えDNA実験安全委員会に実験計画を2000年4月に提出して承認を得た。

## 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

平成14年度は主として凍結した細胞からセルラインを作成することに費やされた。すべての個体から得られた試料より安定したセルラインを作成することは困難で、骨が折れる作業である。しかし、いくつかの工夫を施しながら次々にセルライン化を達成し、既に970以上のセルラインが作成されている。研究の終了までにセルライン化の同意を得た試料について、すべてのセルライン (998名) の作成が終了する予定である。

このセルラインは次々にヒューマンサイエンス財団に寄託されている。

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。

### 2) トランスポーター変異型タンパク質の発現、機能解析

アミノ酸変異を有するABCB1およびABCG2発現ベクターを構築し、昆虫細胞に発現させた。ABCB1については、次のアミノ酸変異蛋白を発現させた N21D, N44S, F103L, V185G, S400N, A893S, A893T, M986V。また、ABCG2については次のアミノ酸変異蛋白を発現させた V12M, Q141K, Q166E, F208S, S248P, E334stop, R482T, R482G。これらのアミノ酸変異型トランスポーターについて、SNPの基質特異性に及ぼす影響をスクリーニング系で調べ、データを収集した。

また、アミノ酸変異をもつABCトランスポーターの機能解析がベジクル輸送方法により可能になり、遺伝子多型と機能 (基質特異性) との関係性をin vitro実験で解明することもできるようにした。最近発見されたヒトABCトランスポーターABCG2 (BCRP) の多型 (Arg, Gly, Thr-482) と基質特異性との関係性について、HEK293細胞発現系を用いて解明し、Arg-482タイプかメトトレキセート (抗癌剤/抗リウマチ薬) を輸送する一方、Gly-482とThr-482

タイプは輸送しないことを発見した。この結果は、ABCトランスポーターの遺伝子多型が薬効と副作用に関連することを強く示唆するものである。

さらに、ヒトABCトランスポーターのcDNAクローニングの際に、ヒトゲノムデータにおいて新規遺伝子であるABCC13を発見し、それらのcDNAのクローニングに成功した。胎児肝臓および骨髄細胞、ある種の白血病細胞に高い発現が確認された。

#### D 考察

本研究によって得られた成果は大きい。まず、日本人を対象として行われる医学、医療研究のコントロール試料が達成されたこととなる。しかも、その試料の取得方法や手続きが完全に公開され、倫理的指針やガイドラインに則していることが極めて重要である。本研究における試料採取については読売新聞などでも好意的に大きく報道され、記者自身が試料等提供者となったと報道されている。このように、国民に公開された上での試料採取であったので、もし、問題があればそれは明示されており、改善できることになる。

現在、日本の多くの大学、研究所、企業で疾患などを対象としたケース・コントロール研究が数多く行われているか、ケースの試料は得られてもコントロールの試料が得られないというのか現状である。その意味で、本研究により得られた試料は極めて多くの研究に貢献するであろう。すでに、ヒューマンサイエンス財団からの研究者たちへの試料の配布が開始されている。

さらに、本研究で得られた試料を用いれば、どのような遺伝子の多型研究にも用いることができる。しかも、それによって倫理問題などの大きな問題が生じることを細心の注意により防止していることが重要である。

本研究プロジェクトにおいて示されたように、遺伝子多型と薬物動態との関連性を包括的に研究することは重要であり、その結果は医薬品の薬理効果／副作用における個人差の解明に広く応用されるものと考えられる。薬物動態関連遺伝子、特に吸収・分布・排泄に関与するトランスポーター等のSNPとその機能を解明することにより、遺伝子多型と薬の効果・副作用に関連する知見が得られ、薬剤の有効性の向上、副作用の低減、レスポンス／ノンレスポンス、海外データのブリッジングの参考等、画期的新薬の研究開発の基盤整備が確立されると考えられる。

#### E 結論

標準的日本人の細胞と遺伝子のサンプルを1000人以上から収集し、セルライン化し、公的バンクに寄託する作業を終了しつつある。薬物動態関連多型解析のためのDNA精製と理化学研究所への送付もすべて終了した。

薬物輸送に関与するABCトランスポーターの基質特異性スクリーニング系が確立し、SNP機能解析のスピード化が可能になった。機能解析の標準的手法(SOP)が確立した。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。また、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。

#### G 研究発表

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*, 293, 67-75, 2002

Yoshikawa, M, Kasamatsu, S, Yasunaga, M, Wang, G, Ikegami, Y, Yoshida, H, Tani, S, Yabuuchi, and H, **Ishikawa, T** Dose ABCG2 need a heterodimer partner? Expression and functional evaluation of ABCG2 (Arg482) *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 17, 130-135, 2002

Yabuuchi, H, Takayanagi, S, Yoshinaga, K, Tanguchi, N, Aburatani, and H, **Ishikawa, T** ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver *Biochem. Biophys Res Commun*, 299, 410-417, 2002

Deng, L, Tatebe, S, Lin-Lee, Y-C, **Ishikawa, T**, and Kuo, M T MDR and MRP Gene families as cellular determinant factors for resistance to clinical anticancer agents In "Clinically Relevant Resistance in Cancer Chemotherapy" Anderson, B and Murray, D (Eds) Kluwer Academic Publishers, Boston, pp 49-66, 2002

**Ishikawa, T** and Yoshikawa, M ABC transporters A new approach to toxicogenomics "Toxicogenomics" Inoue, T and Pennie, W D (EDS) Springer-Verlag, Tokyo, pp109-114, 2003

**Ishikawa, T. Multidrug Resistance Genetics of ABC Transporters** In “Encyclopedia of Human Genome”, Nature Publishing Group, in press, 2003

## 2 学会発表

日米シンポジウム（循環器疾患遺伝子研究の進歩）（ホテルサンパレス大阪） US-Japan Symposium Advances in Genetic Research in Cardiovascular Disease (2003 2/24-25) N Kamatani Methods for the haplotype analysis useful for disease-gene discovery and personalized medicine

第1回創薬ビジョンシンポジウム（昭和大学上條講堂）(2003 1/9-10) テーラーメイド医療の戦略と手法

放医研シンポジウム（オーダーメイド放射線治療を目指して）(2002 1/28-29) 遺伝統計学の理論と手法

AACR 93rd Annual Meeting (2002 04 07-11 San Francisco, USA)

The 1<sup>st</sup> JBS Bio-frontier symposium “Membrane Transporter Structure and Function Relationship -Insights into ABC Transporter- (2002 06 09-11湯布院)

第29回日本トキシコロジー学会学術年会 (2002 06 18-20名古屋)

第17回薬物動態学会年会 シンポジウム (2002 11 20-22千葉)

日本製薬工業協会医薬品評価委員会基礎研究部会ゲノムセミナー「探索動態スクリーニングにおけるゲノム技術の応用と将来像」 (2003 01 20 東京)

平成 14 年度厚生労働省科学研究費補助金ヒトゲノム 再生医療等研究推進事業研究成果発表会「よくわかるヒトゲノム・再生医療等の現状と今後」(2003 01 24 東京)

ファルマスニッソプコンソーシアム講演会 (2003 01 30東京)

H 知的財産権の出願・登録状況  
特記すべき事項はない

1 試料等ドネーションの標準的手法の研究と検証（収集、DNA 調製、保管、セルライン化）  
鎌谷直之

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

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

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

研究要旨

本研究の目的の一つは、日本人の標準的な人たちの細胞と遺伝子の試料を作成し、研究者が利用できるようにすることであった。平成 12 年度にボランティアの募集を開始し、平成 13 年度は最終的に 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、その後、SNP 頻度解析用の DNA 調製法により、1032 人の DNA を調製し、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。平成 13 年度、平成 14 年度では凍結した細胞からセルラインを作成することに費やされた。既に 970 人以上のセルラインが作成されており、研究の終了までに目的とするすべてのセルライン（998 人分）の作成が終了する予定である。セルラインは次々にヒューマンサイエンス財団に寄託している。ほとんどすべてのインフォームド・コンセントが得られた人々の試料がセルラインとして樹立され、ヒューマンサイエンス財団に寄託されるであろう。これらの試料は多くの研究者に貴重な試料として有益に使われ、将来の薬剤開発や日本人の健康維持に貢献するであろう

A 研究目的

本研究の目的は、日本人の標準的な人たちの細胞と遺伝子の試料を倫理問題に十分配慮した体制で作成し、研究者が利用できるようにすることと、それを用いて薬物動態に関連する遺伝子の多型の頻度解析を行うことであった。

ところが、ヒトの試料を用いるためには大きな倫理問題がある。その内容は単純ではなく、インフォームド・コンセント、匿名化、情報保護など多くのものを含んでいる。しかも、その内容が未だ多くの国民、研究者、医師に理解されていないという問題があった。そこで、この研究では、倫理問題を徹底的に分析し、それに即したシステムを開発し、日本でヒト組織を有益に用いるための環境を整えることも大きな目的とした。

B 研究方法

ホームページを作成してボランティアを募り、東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センターで

採血を行って、性別、年齢などの個人非識別情報を収集した後、DNA 調製を行った。また、セルライン作成のために単核球を凍結する。DNA は調製した後、理化学研究所に送付する。凍結した細胞は、少しずつ融解し、EB ウイルスによるセルライン化を行った。

匿名化のためのシステムを開発し、連結不可能匿名化を行う。作成したセルラインは順次、公的バンクに寄託した。

（倫理面への配慮）

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」と、ファルマ スニップ コンソーシアム（PSC、代表 隅野靖弘）の倫理審査委員会の承認を得る。研究計画に変更があった場合には、直ちに倫理審査委員会に計画の修正を申請し、許可を得た後に実行した。

試料はすべて連結不可能匿名化を行う。即ち、来院時の個人票の名前など、個人識別可能なもの

については直ちに紙の部分を切り離し、番号にする。また、それらの番号を100個程度集まった段階で、再度、匿名化する。対応表は作らない。以上のような二段階匿名化を行った。

インフォームド・コンセントについても、用紙を含めて倫理審査委員会の承認を受けたものを用いた。インフォームド・コンセントは、本計画に使用するための許可、今後の他の遺伝子研究に用いるための許可、セルライン化のための許可を別個に取得した。それを厳密に適用して研究を推進した。例えば、セルライン化の許可が得られなかった試料等については、セルライン化しなかった。現在、連結不可能匿名化のため、検体が誰のものか知ることは不可能である。

### C 研究結果

本研究の目的の一つは、日本人の標準的な人たちの細胞と遺伝子の試料を作成し、研究者が利用できるようにすることであった。これは今後の日本の医学、医療の研究と発展のために極めて大切なことである。なぜなら、多くの医学、医療の研究が動物での研究だけでなく、実際にヒトの試料で研究する必要が生じているからである。

ところが、ヒトの試料を用いるためには大きな倫理問題がある。その内容は単純ではなく、インフォームド・コンセント、匿名化、情報保護など多くのものを含んでいる。しかも、その内容が未だ多くの国民、研究者、医師に理解されていないという問題があった。

本研究は平成12年度、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。それは、開始時には三省による倫理指針が発表されていなかったからである。三省による倫理指針が発表されてからは三省による倫理指針にも適応して進められている。しかし、三省の倫理指針より、厚生省による指針の方が厳しく、前指針に従って問題が無い場合はそのまま前指針に従って行った。

例えば、前指針では、「遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会」に外部の委員を半分以上含むことが義務付けられていたが、三省の倫理指針では義務ではない。また、外部の調査委員による調査と報告についても、前指針のほうが厳しい内容になっている。

平成12年度に試料等の提供を受けるための同意・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、PSCのホームページを通じてボランティアの募集を開始した。平成

13年度は最終的に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、た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。この匿名化は、最初の登録の段階で一回、その後、個人情報管理者の手で一回と、計二回行った。

その後、SNP頻度解析用のDNA調製法により、1032人のDNAを調製し、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(998人)についてのみ細胞を凍結した。

平成14年度は主として凍結した細胞からセルラインを作成することに費やされた。すべての個体から得られた試料より安定したセルラインを作成することは困難で、骨が折れる作業である。しかし、いくつかの工夫を施しながら徐々にセルライン化を達成し、既に970人以上のセルラインが作成されている。研究の終了までに目的とするすべてのセルライン(998人分)の作成が終了する予定である。

このセルラインは次々にヒューマンサイエンス財団に寄託されている。ほとんどすべてのインフォームド・コンセントが得られた人々の試料がセルラインとして樹立され、ヒューマンサイエンス財団に寄託されるであろう。

### D 考察

本研究によって得られた成果は大きい。まず、日本人を対象として行われる医学、医療研究のコントロール試料が達成されたこととなる。しかも、その試料の取得方法や手続きが完全に公開され、倫理的指針やガイドラインに則している事が極めて重要である。本研究における試料採取については読売新聞などでも好意的に大きく報道され、記者自身が試料等提供者となったと報道されている。このように、国民に公開された上での試料採取であったので、もし問題があればそれは明示されており、改善できることになる。

また、本研究において得られた試料のサイズもほとんどの研究に対処できるほど十分である。この試料のサイズが大きくなると匿名化の意味が十



分に発揮できない。なぜなら、あまりに試料サイズが少ないと、性別や年齢だけで個人が特定される可能性も考えられるからである。本研究では1032人のボランティアの試料提供があった。ということは、性別や年齢の情報だけでは個人を特定することは不可能である。

現在、日本の多くの大学、研究所、企業で疾患などを対象としたケース・コントロール研究が数多く行われているが、ケースの試料は得られてもコントロールの試料が得られないというのが現状である。その意味で、本研究により得られた試料は極めて多くの研究に貢献するであろう。すでに、ヒューマンサイエンス財団からの研究者たちへの試料の配布が開始されている。

本研究によって得られたSNPのデータも新しい薬物の開発や、テーラーメイド医療（オーダーメイド医療）の進展に大きな影響を及ぼすであろう。すべての遺伝子を基礎にした薬物の反応性の研究に、本研究で得られたデータが用いられる。また治験に遺伝子データが用いられるようになればさらに重要な試料になる。さらに、本研究で得られた試料を用いれば、どのような遺伝子の多型研究にも用いることができる。しかも、それによって倫理問題などの大きな問題が生じる事を細心の注意により防止していることが重要である。

#### E 結論

標準的日本人の細胞と遺伝子のサンプルを1000人以上から収集し、セルライン化し、公的バンクに寄託する作業を終了しつつある。薬物動態関連多型解析のためのDNA精製と理化学研究所への送付もすべて終了した。

F 健康危険情報  
なし。

#### G 研究発表

1 論文発表  
なし

#### 2 学会発表

- a 日米シンポジウム（循環器疾患遺伝子研究の進歩）（ホテルサンパレス大阪）  
US-Japan Symposium Advances in Genetic Research in Cardiovascular Disease  
平成15年2月24-25日  
N Kamatani Methods for the haplotype analysis useful for disease-gene discovery and personalized medicine
- b 第1回創薬ビジョンシンポジウム（昭和大学上條講堂）  
平成15年1月9-10日  
テーラーメイド医療の戦略と手法
- c 放医研シンポジウム（オーダーメイド放射線治療を目指して）  
平成15年11月28-29日  
遺伝統計学の理論と手法

#### H 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
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

厚生労働科学研究費補助金（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

薬物輸送に関与するABCトランスポーターの基質特異性スクリーニング系が確立し、SNP機能解析のスピード化が可能になった。そして、機能解析の標準的手法（SOP）が確立した。特にABCB1とABCG2に関して、ABCトランスポーターの遺伝子多型が薬効と副作用に関連することを強く示唆する結果が得られた。PSCを中心にして国内の共同研究体制が整い、広く薬物トランスポーター遺伝子のSNP機能解析を研究する基盤が構築された。

A 研究目的

薬剤応答性に関連する遺伝子を解明し、最適な薬物療法の実現等を推進すること、即ち薬が効く患者と効かない患者の遺伝子の塩基配列を比較することにより、遺伝子多型と薬の効果・副作用との関連を解明することは重要である。収集した試料等により薬物動態関連遺伝子のSNPと機能について解析する。我々は、薬物輸送に関係するトランスポーターの発現系の構築、および基質特異性測定用スクリーニング系の構築を担当する。そして、アミノ酸が変異するSNPを持つ薬物トランスポーターの機能解析を行い、薬物動態に影響すると予想されるSNPを同定するとともに、SNPによって影響を受ける薬物を発見する。

B 研究方法

薬剤輸送に関与するABC（ATP-binding cassette）トランスポーター遺伝子上のSNP機能解析するにあたって、まずヒトABCトランスポーター遺伝子、ABCB1, ABCC1, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCG2の完全長cDNAをクローニングした。そして次に、NCBIのSNPデータおよび健常日本人のSNPデータに基づき、site-directed mutagenesis法によりABCB1およびABCG2 cDNAにSNPを導入した。そのcDNAを哺乳類細胞または昆虫細胞に発現させるベクターに組み込んだ。哺乳類細胞にトランスポーターを発現させるにはpcDNA3.1ベクターを用い、

Sf9昆虫細胞に発現させるにはpFastBacベクターを用いた。後者の場合、ベクターから発現用バキュロウイルスを作成した後、昆虫細胞にウイルスを感染させてトランスポーターのタンパク質を発現させた。タンパク質の発現は特異的抗体をもちいたウエスタンブロットで確認した。また、pcDNA3.1ベクターを用いてトランスポーターを発現させる場合は、形質転換した哺乳類細胞（例えばHRK293細胞）のサブクローニングを行い、安定発現細胞を得た。薬物輸送能を細胞レベルで観測する一方、動力学的解析は基質認識能、ATPase活性（ABCB1, ABCG2等）、膜ベジクル系（ABCG2等）での輸送測定によって行った。機能解析のスピード化をはかるために、96穴マイクロタイタープレートを用いた自動化ATPase活性測定装置のプロトタイプを開発した。

（倫理面への配慮）

薬物トランスポーター遺伝子のSNP機能解析研究においては、健常人または患者由来の血液、組織サンプルを用いたヒト遺伝子解析研究を一切行わず、市販のcDNAパネルを使用するのヒト遺伝子倫理規定に反しない。ヒトABCトランスポーター遺伝子の哺乳類細胞およびSf9昆虫細胞における発現実験については、東京工業大学組み換えDNA実験安全委員会に実験計画を2000年4月に提出して承認を得た。

## C 研究結果

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。96穴マルチプレートを用いてATPase活性を測定する方法により、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。薬物輸送に深く関係するヒトABCB1、ABCC1、ABCC2、ABCC11、ABCC12、ABCC13、ABCG2のcDNAをクローニングした。ABCB1およびABCG2については、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る系を確立した。ウイルス感染後3日目に細胞を集め、細胞膜画分をショ糖濃度勾配遠心法により調製した。細胞膜画分におけるヒトABCB1の発現は、特異的な抗体を用いたWestern blot法により確認した。96wellプレートを用いて、精製した形質膜画分を試験化合物とMgATPとともに反応させたのち、加水分解で生じた無機リン酸の量を測定することにより、活性を評価した。活性は、1分間に1mgの膜タンパク質によって生じた無機リン酸の量 (nmol Pi/min/mg protein) で定量化した。その方法と測定装置を用いて、既存の医薬品約50種類 (Caチャンネル阻害剤、Kチャンネル開口剤、ステロイド剤、非ステロイド系抗炎症剤、抗癌剤、抗生物質、免疫抑制剤、神経伝達物質等) に関してABCB1の基質特異性のプロファイリングをおこなった。

アミノ酸変異をもつABCB1およびABCG2発現ベクターを構築し、昆虫細胞に発現させた。ABCB1については、次のアミノ酸変異蛋白を発現させた N21D, N44S, F103L, V185G, S400N, A893S, A893T, M986V。また、ABCG2については次のアミノ酸変異蛋白を発現させた V12M, Q141K, Q166E, F208S, S248P, E334stop, R482T, R482G。これらのアミノ酸変異型トランスポーターについて、SNPの基質特異性に及ぼす影響をスクリーニング系で調べ、データを収集した。

また、アミノ酸変異をもつABCトランスポーターの機能解析がベシクル輸送方法により可能になり、遺伝子多型と機能 (基質特異性) との関係をもin vitro実験で解明することもできるようにした。最近発見されたヒトABCトランスポーターABCG2 (BCRP) の多型 (Arg, Gly, Thr-482) と基質特異性との関係をHEK293細胞発現系を用いて解明し、Arg-482タイプがメトトレキサート (抗癌剤/抗リウマチ薬) を輸送する一方、Gly-482とThr-482タイプは輸送しないことを発見した。この結果は、ABCトランスポーターの遺伝子多型か薬効と副作用に関連することを強く示唆するものである。

さらに、ヒトABCトランスポーターのcDNAクローニングの際に ヒトゲノムデータにおいて新規遺

伝子であるABCC13を発見し、それらのcDNAのクローニングに成功した。胎児肝臓および骨髄細胞、ある種の白血病細胞に高い発現が確認された。

一方、ABCトランスポーター以外の薬物トランスポーター (例えば、OAT, OCT等) についてもSNPデータに基づいて、アミノ酸置換をもつ蛋白質の発現系を構築して機能解析を行っている。PSCを中心にして国内の共同研究体制 (機密保持契約、共同研究覚書) を整えて、遠藤 仁教授 (杏林大医学部)、辻 彰教授 (金沢大薬学部)、乾 賢一教授 (京都大医学部付属病院)、和田守正助教授 (九州大医学部) が参画した。現在、この共同研究体制において、OAT1, OCT1, OCT2, OCTN1, PEPT1, ABCB1, ABCB11, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCG2について、アミノ酸転移SNPを持つタンパク質を発現させて、その機能解析研究に着手した。

## D 考察

ヒトゲノム解析の急速な進展によって、数多くのトランスポーター遺伝子が発見されてきた。ABCB1 (P-糖蛋白質, MDR1) やABCC1 (MRP1)、ABCC2 (cMOAT)、ABCG2 (BCRP/ABCP) 等に代表されるABCトランスポーターは肝臓や小腸をはじめ血液脳関門にも多く発現して、薬物の臓器分布に大きな影響を与えているという証拠が蓄積しつつある。特に、本研究プロジェクトにおいて、ABCG2 (BCRP) の多型 (Arg, Gly, Thr-482) と基質特異性との関係を解明し、Arg-482タイプがメトトレキサート (抗癌剤/抗リウマチ薬) を輸送する一方、Gly-482とThr-482タイプは輸送しないことを、我々は世界で初めて発見した。ABCG2はイリノテカン等の抗癌剤の輸送にも関与していることが報告されており、このトランスポーター遺伝子の多型と抗癌剤に対する薬剤応答性に個人差のあることが予想される。したがって、遺伝子多型の機能解析は必須であり、且つ今後臨床データとのリンクが益々重要になると考えられる。

本研究プロジェクトにおいて示されたように、遺伝子多型と薬物動態との関連性を包括的に研究することは重要であり、その結果は医薬品の薬理効果/副作用における個人差の解明に広く応用されるものと考えられる。薬物動態関連遺伝子、特に吸収・分布・排泄に関与するトランスポーター等のSNPとその機能を解明することにより、遺伝子多型と薬の効果・副作用に関連する知見が得られ、薬剤の有効性の向上、副作用の低減、レスポンス/ノンレスポンス、海外データのブリッジングの参考等、画期的新薬の研究開発の基盤整備が

確立されると考えられる。事実、米国FDAは近いうちに、新薬の臨床開発申請の際に必要な遺伝子多型らのファーマコゲノミクス情報に関するガイドンスを発表する予定である。そうして、しだいにゲノム研究に対するパブリック・アクセプタンスが高まると予想される。

## E 結論

薬物輸送に関与するABCトランスポーターの基質特異性スクリーニング系が確立し、SNP機能解析のスピード化が可能になった。機能解析の標準的手法(SOP)が確立した。ABCG2に関して、ABCトランスポーターの遺伝子多型が薬効と副作用に関連することを強く示唆する結果が得られた。PSCを中心にして国内の共同研究体制を整えて、広く薬物トランスポーター遺伝子のSNP機能解析を研究する基盤が構築された。本研究プロジェクトの枠組みにおいて、約10種類の薬物トランスポーターに関して、SNP機能解析が2003年中に完了する。その研究成果は総説としてまとめられて、発表される予定である。一方、本研究プロジェクトでは対象にならなかった薬物トランスポーターも多数あり、今後それらのSNP機能解析を継続していく必要がある。特に、薬物トランスポーター研究は我が国の研究者が世界をリードしている分野であり、且つ本研究プロジェクトにおいて国内の共同研究体制が確立したので、さらなる研究の継続が強く望まれる。

## 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*, 293, 67-75, 2002

Yoshikawa, M, Kasamatsu, S, Yasunaga, M, Wang, G, Ikegami, Y, Yoshida, H, Tarui, S, Yabuuchi, and H, **Ishikawa, T** Dose ABCG2 need a heterodimer partner? Expression and functional evaluation of ABCG2 (Arg482) *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 17, 130-135, 2002

Yabuuchi, H, Takayanagi, S, Yoshinaga, K, Taniguchi, N, Aburatani, H, and **Ishikawa, T.** ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver *Biochem Biophys Res Commun*, 299, 410-417, 2002

Deng, L, Tatebe, S, Lin-Lee, Y-C, **Ishikawa, T,** and Kuo, M T MDR and MRP Gene families as cellular determinant factors for resistance to clinical anticancer agents In "Clinically Relevant Resistance in Cancer Chemotherapy" Anderson, B and Murray, D (Eds) Kluwer Academic Publishers, Boston, pp 49-66, 2002

**Ishikawa, T** and Yoshikawa, M ABC transporters A new approach to toxicogenomics "Toxicogenomics" Inoue, T and Pennie, W D (EDS) Springer-Verlag, Tokyo, pp109-114, 2003

**Ishikawa, T.** Multidrug Resistance Genetics of ABC Transporters In "Encyclopedia of Human Genome", Nature Publishing Group, in press, 2003

### 2 学会発表

AACR 93rd Annual Meeting (2002 04 07-11 San Francisco, USA)

The 1<sup>st</sup> JBS Bio-frontier symposium "Membrane Transporter Structure and Function Relationship -Insights into ABC Transporter- (2002 06 09-11湯布院)

第29回日本トキシコロジー学会学術年会 (2002 06 18-20名古屋)

第17回薬物動態学会年会 シンポジウム (2002 11 20-22千葉)

日本製薬工業協会医薬品評価委員会基礎研究部会ゲノムセミナー「探索動態スクリーニングにおけるゲノム技術の応用と将来像」 (2003 01 20 東京)

平成 14 年度厚生労働省科学研究費補助金ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業研究成果発表会「よくわかるヒトゲノム 再生医療等の現状と今後」 (2003 01 24 東京)

ファルマ スニソップ コンソーシアム講演会  
(2003 01 30 東京)

H 知的財産権の出願・登録状況  
特記すべき事項はない

## 別紙 6

## 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
Ishikawa, T	Multidrug Resistance Genetics of ABC Transporters	"Encyclopedia of Human Genome", Nature Publishing Group		in press 1-8	2003
Ishikawa, T. and Yoshikawa, M	ABC transporters A new approach to toxicogenomics	Toxicogenomics, (Ed T Inoue, W D Pennie), Springer-Verlag		109-114	2002
Deng, L., Tatebe, S, Lin-Lee, Y -C, Ishikawa, T. and Kuo, M T	MDR and MRP Gene families as cellular determinant factors for resistance to clinical anticancer agents	"Clinically Relevant Resistance in Cancer Chemotherapy" Anderson, B and Murray, D (Eds) Kluwer Academic Publishers, Boston,		49-66	2002
Yabuuchi, H, Takayanagi, S, Yoshinaga, K., Taniguchi, N, Aburatani, H and Ishikawa, T	ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver	Biochem Biophys Res Commun	299	410-417	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 (Arg482)	Drug Metabolism and Pharmacokinetics	17	130-135	2002
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	293	67-75	2002