

20030635

別紙2

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

トキシコプロテオミクス:ABCトランスポーターの

遺伝子発現と薬物相互作用の解析に関する研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 石川 智久

平成16(2004)年4月

目 次

I. 総括研究報告

トキシコプロテオミクス：ABCトランスポーターの遺伝子発現と薬物相互作用 の解析に関する研究	1
石川 智久	

II 分担研究報告

1. ABCトランスポーターの医薬品、化学物質に対する 薬物相互作用スクリーニング	7
石川 智久	
2. 薬物トランスポーターの遺伝子発現プロファイリング	18
油谷 浩幸	
3. 医薬品・化学物質のデータベース化	22
中田 琴子	

III 研究成果の刊行に関する一覧表	26
--------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進等研究事業）

総括研究報告書

トキシコプロテオミクス ABCトランスポーターの遺伝子発現と薬物相互作用の解析に関する研究

主任研究者 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

ヒトABCトランスポーターの基質特異性解析と薬物相互作用のハイスループット化をめざし、96ウェルプレートを用いた高速スクリーニング装置を2種類開発した。ABCB1のATPase活性測定データを基に、Chemical Fragmentation Codesを用いた構造活性相関の定量的解析をおこない薬物相互作用を予測する技術的基盤を構築した。ヒトABCトランスポーター49種類の全遺伝子について、転写開始点より5kb上流のプロモーター解析を行い、その結果をウェブで一般公開した。in silico探索により、核内受容体LXRの標的遺伝子としてABCトランスポーター6種を同定した。また、マイクロアレイを用いて、薬物投与したラット肝臓におけるABCトランスポーターの遺伝子発現プロファイリングを実行した。時系列データの解析には、決定木を含むLeave one out cross validation (LOOCV)法を検討した。さらに、医薬品や毒性研究の情報基盤整備のために、医薬品や内分泌かく乱化学物質等の体内標的として酵素やトランスポーターに関する種々のデータを収集整理してデータベース化した。

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
油谷浩幸	東京大学 国際産学共同研究センター 教授
中田琴子	国立医薬品食品衛生研究所 室長

的な創薬分子設計戦略と副作用の低下（安全性の向上）に大きく貢献するものと考えられる。本研究プロジェクトにおいて我々は、薬物トランスポーターの観点から薬物の副作用を予測する技術を開発することに目標をおく。具体的には（1）薬物輸送に関与するヒトABCトランスポーターの基質特異性スクリーニングを構築する。（2）既存の医薬品および化学物質に対するABCトランスポーターの基質特異性をデータベース化し、薬物相互作用の予測プログラムを開発する。（3）ヒト組織に特異的に発現するABCトランスポーターの定量的発現プロファイリングを行う。（4）ヒトゲノムデータに基づきABCトランスポーター遺伝子のプロモーター領域の解析を行い、核内受容体を含む転写制御因子を予測する。（5）転写領域の解析と発現プロファイリングに基づき、ヒト組織における薬物相互作用を予測する。（6）医薬品や内分泌かく乱化学物質等の体内標的として酵素やトランスポーターに関する種々のデータを収集整理してデータベース化する。

A 研究目的

個々の患者における薬剤応答の差異の根幹である分子機構について評価することが必要である。このことを成し遂げる第一歩は、薬物の吸収、分布、代謝、排泄(ADME)に関与するトランスポーターと薬物代謝酵素の遺伝学的および分子生物学的研究である。近年になって、数多くの薬物トランスポーターが小腸や腎臓の上皮細胞、肝細胞、脳血管内皮細胞に発現し、薬物の輸送に関与していることが明らかになってきた。薬物トランスポーターの基質特異性とその薬物動態上の意義を定量的に解析する事は、ポストゲノム時代における合理

B 研究方法

薬物トランスポーターの基質スクリーニング

(石川分担) ABCトランスポーター cDNAをBAC-TO-BACバキュロウイルス発現系を用いて、それぞれ昆虫細胞に発現させる。cDNAをpFASTBACに組み込み、DH10Bacへ導入して組み換えBacmid DNAを作成する。Sf9昆虫細胞にそのBacmid DNAを導入して、それぞれのcDNAを含むバキュロウイルスを誘導し、Sf9細胞に感染させる。発現したSf9細胞の形質膜を用いて、基質スクリーニングを行う。また一方、pcDNA3.1ベクターを用いて、HEK293等の哺乳類細胞にもABCトランスポーター cDNAを発現させて、昆虫細胞で得られた結果と比較検討する。またヒトゲノムデータに基づきABCトランスポーター遺伝子の5'-プロモーター領域の解析を行う。

薬物トランスポーター発現解析用マイクロアレイ

(油谷分担) トランスポーター遺伝子の臓器特異的な発現プロファイルおよび薬剤投与時や種々の病態に際しての発現の変動をモニタリングするために、電極上にプローブを配置した高感度な三次元マイクロアレイシステムを用いてDNAチップの作成を行う。選択的スプライシング産物についても特異的なプローブ配列をデザインすることにより検出が可能である。アレイを用いて輸送蛋白遺伝子以外に代謝酵素などの薬物動態関連遺伝子についても解析する。

既存の医薬品および化学物質に対する基質特異性および薬物相互作用データベースの作成

(中田分担) 医薬品や毒性研究の情報基盤整備のために、医薬品や内分泌かく乱化学物質等の体内標的として酵素やトランスポーターに関する種々のデータを収集整理してデータベース化している。それをさらに発展させて、医薬品/化学物質と体内標的の構造データ、結合親和性、細胞内信号伝達情報、SNP情報等を含め、体内標的と薬物相互作用解析の基礎データを提供する。

C. 研究結果

平成15年度、研究代表(石川)グループは、ヒトABCトランスポーターの基質特異性解析と薬物相互作用検出の高速スクリーニング装置を開発した。96wellプレート高速スクリーニング系を用いて、ABCB1 (P-糖蛋白質/MDR1)の基質特異性の構造活性相関を解析した。そのデータを基に、Chemical Fragmentation Codesを用いた構造活性相関の定量的解析をおこなった。そのためにまず、試験化合物の構造式をMarkush TOPFRAG ver3.1に入力

し、Chemical Fragmentation Codesを発生させた。試験化合物濃度10 μ MにおけるATPaseの阻害活性(ベラパミルに対する比活性)を目的変数とし、ケミカルフラグメントコードの有無をダミー変数として線形重回帰を行った。

一方、ヒトABCG2 cDNAをPCRによりクローニングし、pFastBacベクターに組み込んだ。次いでそのベクターから発現用バキュロウイルスを作成し、Sf9昆虫細胞にウイルスを感染させてABCG2タンパク質を発現させた。³Hラベルした抗癌剤メソトレキセートの輸送能力を指標にして、ABCG2における薬物相互作用を調べた。

さらに、公開されているゲノム情報とTRANSFACプログラムを用いて、ヒトABCトランスポーター49種類の全遺伝子について、転写開始点より5kb上流のプロモーター解析を行い、その結果をウェブ(<http://www.humanABC.bio.titech.ac.jp>)で一般公開した。

一方、研究分担者の油谷グループは、薬物投与後の時系列データの解析アルゴリズムを開発し、ラット肝臓における遺伝子発現プロファイル解析に応用した。DNAマイクロアレイの実験で得られるデータを解析する方法には様々なものが提案されているが、その殆どは時系列データを解析するには不向きなものである。この点を克服するために、決定木を用いた解析手法を考案した。Leave one out cross validation (LOOCV)法では、51回の試行のうち最初に取り除いた1つのサンプルを正確に分類できたのは41個で、80.4%の正確さだった。各回の試行で、分類に使われる遺伝子群として25個の遺伝子を抽出した。

アセトアミノフェン0.3g/kg、2.0g/kg経口投与を行ったラットおよびControlラットを投与48時間後に剖検し、摘出した肝臓よりRNAを抽出し、肝組織における遺伝子発現変動を検討した。その結果、0.3g/kgで発現低下と判断されたのはAbcg5、2.0g/kgで発現低下と判断されたのはAbcb11、Abcc2、Abcc6の3遺伝子であり、Abcc3については増加していた。

研究分担者の中田グループは、医薬品や毒性研究の情報基盤整備のために、医薬品や内分泌かく乱化学物質等の体内標的として酵素やトランスポーターに関する種々のデータを収集整理してデータベース化した。そして試験的に<http://molddb.nih.gov/tgdb>にweb化した。また、核内受容体LXRの標的遺伝子を探索した結果、ABCトランスポーター6個とCYP7個の遺伝子、およびそのLXR応答配列の位置をin silicoで同定できた。

D 考察

ヒトABCトランスポーターの基質特異性解析と薬物相互作用のハイスループット化をめざし、昆虫細胞発現系と96ウェルプレートを用いた高速スクリーニング装置を2種類開発した(ABCBIのATPase活性測定装置およびABCG2の形質膜ベシクル輸送活性測定装置)。これらの装置により、スクリーニングが10倍以上スピードアップした。そして、ABCBIのATPase活性測定データを基に、Chemical Fragmentation Codesを用いた構造活性相関の定量的解析をおこなった。この解析方法はABCBI(P-糖蛋白質)以外のトランスポーターにも応用できるばかりでなく、薬物相互作用をおこす医薬品や化合物を予測することが出来る。さらに、ヒトABCトランスポーター49種類の全遺伝子について、転写開始点より5kb上流のプロモーター解析を行い、その結果をウェブ(<http://www.humanABC.bio.titech.ac.jp>)で一般公開した。今後は、以下にも述べるように、核内受容体の結合領域も*in silico*解析して、並記することが重要であろうと考える。

DNAマイクロアレイの時系列データの解析に、決定木を用いたデータマイニングは応用できることが示された。今後は発現値の時系列データどうしの比較が出来るように手法を改良する必要がある。今後の最優先課題は、データの時系列としての特性をそのまま使った解析手法の開発である。これは、再帰的にノードを分割して行く際、どのような分類手法を使うかという問題になる。機械学習の分野では、様々な分類手法が提案されている。中でもsupport vector machine (SVM) は遺伝子発現情報の解析にも広く用いられている。決定木を生成する際、SVMを使ってノードの分割を定義する方法を次年度において開発してゆく予定である。

標的データベース中の医薬品については、現在日本の医薬品(JAN)のみ含めたが、今後欧米の医薬品についても含めていく予定である。標的については対応付けが未完で更新中である。酵素やトランスポーターの3次元構造についての実験結果が増加することを期待している。標的遺伝子の*in silico*探索を行い、LXRについて新たにABCトランスポータ6個、CYP7個の標的遺伝子とその応答配列の位置を同定したが、実際に機能するか否かは実験により確かめる必要がある。既知応答配列をLXR α とLXR β にわけると高い精度のマルコフ連鎖モデルを構築することができるが、検索に十分なモデルを構築するためには既知応答配列を多数収集する必要がある。

ある。また応答配列の下流についてはイントロン内を解析する必要があるなどの問題を含んでいる。今後さらに詳細を検討していきたい。

E 結論

本研究プロジェクトにおいて、薬物トランスポーターの観点から薬物の副作用を予測する技術の開発は着実に進んでいる。具体的には次の通りである。薬物輸送に関与するヒトABCトランスポーターの基質特異性スクリーニングが構築され、Chemical Fragmentation Codesを用いた構造活性相関の定量的解析が可能になった。ABCトランスポーターの発現プロファイリングを時系列解析する方法も開発された。さらに、ヒトゲノムデータに基づきABCトランスポーター遺伝子のプロモーター領域の解析を行い、核内受容体LXRを含む転写制御因子を予測することが可能になった。そして、医薬品や内分泌かく乱化学物質等の体内標的として酵素やトランスポーターに関する種々のデータを収集整理してデータベース化し、webで公開した。来年度は、これまで研究分担者が構築したデータベースを相互にリンクし、トキシコゲノミクスにおけるヒトABCトランスポーターと医薬品との相互作用を総合的に評価できるようにする予定である。

F 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Mitomo, H, Kasamatsu, S, Ito, K., Ikegami, Y., **Ishikawa, T.** A functional study on the polymorphism of ATP-binding cassette transporter ABCG2 Critical role of Arg-482 in Methotrexate transport *Biochem J*, 373, 767-774, 2003
- 2) Shimizu, H, Tamiguchi, H, Hippou, Y, Yashuzaki, Y, Aburatani, H and **Ishikawa, T.** Characterization of mouse Abcc12 gene and its transcript encoding an ATP-binding cassette transporter, an orthologue to human ABCC12 *Gene*, 310, 17-28, 2003
- 3) **Ishikawa, T.**, Kasamatsu, S, Hagiwara, Y, Mitomo, H, Kato, R, and Sumino, Y Expression and Functional Characterization of Human ABC Transporter ABCG2 Variants in Insect Cells *Drug Metabol and Pharmacokin.*, 18,194-202, 2003

- 4) Takayanagi, S, **Ishikawa, T.**, Molecular Identification and Characterization of Rat Abcc1 cDNA Existence of two splicing variants and species difference J of Exp Ther and Oncol, 3, 136-146, 2003
- 5) Sano, K., Yoshikawa, M, Hayakawa, S, Ikegami, Y, Yoshida, H, **Ishikawa, T.**, Sawada, S, and Tanabe, S Simple non-ion-paired high performance liquid chromatographic method for simultaneous quantification of carboxylate and lactone forms of 14 new camptothecin derivatives J Chromatogr B, 795,25-34, 2003
- 6) Onishi, Y, Hirano, H, Nakata, K., Oosumi, K., Nagakura, M, Tarui, S and **Ishikawa, T.**, High-speed screening and structure-activity relationship analysis for the substrate specificity of P-glycoprotein (ABCB1) Chem-Bio Informatics J, 3, 175-193, 2003
- 7) Watanabe A, Hippo Y, Taniguchi H, Iwanari H, Yashiro M, Hirakawa K, Kodama T, **Aburatani H.** An Opposing View on WWOX Protein Function as a Tumor Suppressor Cancer Res 63(24) 8629-8633 2003
- 8) Ge X, Tsutsumi S, **Aburatani H.** Iwata S Reducing false positives in molecular pattern recognition. Genome Informatics 14 34-43, 2003
- 9) Mizukami M, Hasegawa H, Kohro T, Toko H, Kudoh T, Zou YZ, **Aburatani H.** Komuro I Gene expression profile revealed different effects of angiotensin II receptor blockade and angiotensin-converting enzyme inhibitor on heart failure Journal of cardiovascular pharmacology 42 S1-S6, Suppl 1 2003
- 10) Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, **Aburatani H.** Sugiyama Y Functional characterization of rat brain specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier High affinity transporter for thyroxine J Biol Chem. 278(44) 43489-95, 2003
- 11) Satoh T, Baba M, Nakatsuka D, Ishikawa Y, **Aburatani H.** Furuta K, Ishikawa T, Hatanaka H, Suzuki M, Watanabe Y Role of heme oxygenase-1 protein in the neuroprotective effects of cyclopentenone prostaglandin derivatives under oxidative stress Eur J Neurosci 17(11) 2249-2255 2003
- 12) Fujiwara Y, Yokoyama M, Sawada R, Seyama Y, Ishu M, Tsutsumi S, **Aburatani H.** Hanaka S, Itakura H, Matsumoto A. Analysis of comprehensive effects of polyunsaturated fatty acid on mRNA expression using a GeneChip J Nutr Sci Vitaminol, 49 125-132 2003
- 13) Kano M, Nishimura K, Ishikawa S, Tsutsumi S, Hirota K, Hirose M, **Aburatani H.** Expression Imbalance Map A New Visualization Method for Detection of mRNA Expression Imbalance Regions Physiol Genomics 13 31-46, 2003
- 14) Toda, K., Ishida, S, **Nakata, K.**, Matsuda, R, Shigemoto-Mogami, Y, Ozawa, S, Sawada, J Inoue, K., Shudo, K. and Hayashi, Y Improvement in Reliability of Probabilistic Test of Significant Differences in GeneChip Experiments Anal Sci (in press)
- 15) Fukuzawa, K, Kitaura, K., **Nakata, K.**, Kaminuma, T and Nakano, T Fragment molecular orbital study of the binding energy of ligands to the estrogen receptor Pure Appl Chem. 75, 2405-2410, 2003
- 16) Toda, K., Ishida, S, **Nakata, K.**, Matsuda, R, Shigemoto-Mogami, Y, Fujishita, K., Ozawa, S, Sawada, J, Inoue, K., Shudo, K., Hayashi, Y Test of significant differences with *a priori* probability in microarray experiments Analytical Sciences, 19, 1529-1535, 2003
- 17) Shimizu, T, Ochiai, H, Asell, F, Yokono, Y, Kikuchi, Y, Nitta, M, Hama, Y, Yamaguchi, S, Hashimoto, M, Taki, K., **Nakata, K.**, Aida, Y, Ohashi, A., Ozawa, N Bioinformatics Research on Inter-racial Difference in Drug Metabolism II Analysis on Relationship between Enzyme Activities of CYP2D6 and CYP2C19 and their Relevant Genotypes Drug Metabolism and Pharmacokinetics 18, 71-78, 2003
- 18) Kaminuma, T, and **Nakata, K.**, Global Information Network on Chemicals Toxicology 190, 93-103, 2003

総説

- 1) **Ishikawa, T.** Multidrug Resistance Genetics of ABC Transporters In "Encyclopedia of Human Genome", Nature Publishing Group, in press, 2003
- 2) 石川智久、清水秀忠、高柳晋一郎、北島正人 ヒトABCトランスポーター 新規遺伝子の探索とSNP機能解析、Bioヘンチャー 3<3>, 96-99, 2003
- 3) 石川智久 トキシコゲノミクスと遺伝子多型-ゲノム創薬から個の医療に向けて 次世代ゲ

- ノム創薬 (日本薬学会編) 中山書店, 157-171, 2003
- 4) 油谷浩幸、平井久丸、杉山雄一 ポストゲノム時代の医療 (鼎談) 現代医療 35(7) 1428-1443, 2003
 - 5) 油谷浩幸 ゲノム創薬とプロテオミクス Medical Briefs in Cancer 8(3) 10-11, 2003
 - 6) 石川智久、ゲノム創薬と未来産業、エルゼビア・ジャパン, 2003
- 2 学会発表
- 1) 石川智久 AACR 93rd Annual Meeting “ヒトABCトランスポーターの機能解析と創薬分子デザイン” 日本医学会総会 (2003 04 04-6 福岡)
 - 2) 石川智久 がん分子標的治療研究会“ヒトABCトランスポーターの機能解析に基づく創薬分子デザイン” “ヒトABCトランスポーターABCG2の多型における機能解析, メソトレキセート輸送における482残基アミノ酸の重要性” “Breast Cancer resistance Protein BCRP/ABCG2)変異体に対する新規CPT誘導体の影響” (2003 06 02-3 東京)
 - 3) **Ishikawa, T.** JBSバイオフィロンティアシンポジウム “Expression profiling and promoter analysis of human ABC transporter genes” (2003 06 05-7 つくば)
 - 4) 石川智久 第108回日本薬理学会関東部会 “ヒトABCトランスポーターの遺伝子多型と機能解析” (2003 06 14 幕張メッセ)
 - 5) **Ishikawa, T.** The 5th International Workshop on Advanced Genomics “Pharmacogenomics of Human ABC Transporters” (2003 06 26-7 パシフィコ横浜)
 - 6) **Ishikawa, T.** The 2nd International Symposium on Redox Life Science “Pharmacogenomics of human ABC transporters Biological function and gene regulation” (2003 8 20-22 ニセコ東山プリンスホテル)
 - 7) 石川智久 2003年CBI学会大会 “ヒトABCトランスポーター遺伝子のデータベース構築” (2003 09 17-19 こまばエミナース)
 - 8) 石川智久 農芸化学会関西中部支部シンポジウム “ヒトABCトランスポーター機能解析からゲノム創薬バイオテクノロジー・クラスター形成へ” (2003 10 04 京都ばるるプラザ)
 - 9) 石川智久 第18回日本薬物動態学会年会 “ヒトABCトランスポーターABCG2における多型の機能解析 メソトレキセート輸送における482残基アミノ酸の重要性” “ヒトABCトランスポーターABCB1とABCG2のSNP機能解析” “ABCG2変異株の機能とSN-38耐性”
 - 10) **Ishikawa, T.** The 6th Conference of Asia-Pacific International Molecular Biology Network(A-IMBN) Dramatic Movement of Life Science Now to Future “Human ABC Transporters, From Genomic Analysis to Database Construction, Functional Screening, and Drug Molecular Design” (2003 11 12-13 東京、日本科学未来館)
 - 11) 石川智久 “ヒト第18回冬季札幌がんセミナー “癌の薬剤耐性と薬物トランスポーターの遺伝子多型” (2/7-8 ロイトン札幌)
 - 12) 油谷浩幸 BioEXPOセミナー (東京) 5/15 遺伝子発現解析を用いた創薬研究への展開
 - 13) 油谷浩幸 Amersham Biosciences Symposium 2003 (東京・大阪) 6/18・19 トランスクリプトーム解析による疾病解析の現状
 - 14) 油谷浩幸 第5回国際ゲノム会議(横浜)6/27 Transcriptome to Integrated Biology
 - 15) 第14回 南大阪がん研究会 (近畿大) 10/16 マイクロアレイ解析の疾患医療への応用
 - 16) 関東腎研究会 (東京) 1/17 Clinical genomics マイクロアレイ解析の医療への応用
 - 17) 愛澤昌宏、小野寺賢司、張軍衛、甘利真司、岩澤義郎、中野達也、中田琴子 KiBank タンパク質-化学物質相互作用解析支援データベース、日本薬学会第124回年会、(大阪、2004年3月)
 - 18) **Nakata, K.,** Momose, H, Tanaka, Y, Tanaka, H and Kaminuma, T Extension of Receptor Database and Drug Targets Biophysical Society 48th Annual Meeting (Baltimore, Feb 2004)
 - 19) **Nakata, K.,** Tokunaga, M, Komiyama, N and Kaminuma, T From Drug Target to Pathways New Horizons in Molecular Sciences and Systems An Integrated Approach. (Okinawa, Oct 2003)
 - 20) Zhang, J MAizawa, M Onodera, K., Amari, S, Iwasawa, Y, **Nakata, K.** KiBank A Database for Molecular Interaction Analysis between Proteins and Chemicals Chem-Bio Informatics Society 4th Annual Meeting (Tokyo, Sep 2003)
 - 21) 百瀬大樹、神沼二真、田中義智、中田琴子、田中博 核内受容体PPARの標的遺伝子の探索、CBI学会第4回年会 (東京、2003年9月)
 - 22) 田中義智、神沼二真、百瀬大樹、中田琴子、

田中博 医薬品の相互作用に関連した核内受容体の標的遺伝子の探索、CBI学会第4回年会(東京、2003年9月)

- 23) **Nakata, K.**, Saithoh, R., Tokunaga, M A
Transporter Database as a Drug Target Database
The 4th International Symposium on Receptor
Mechanisms, Signal Transduction and Drug
Effects (Fuku, 2003 5)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

無し

2 実用新案登録

無し

3 その他

無し

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進等研究事業）

分担研究報告書

ABCトランスポーターの医薬品、化学物質に対する薬物相互作用スクリーニングに関する研究

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

ヒトABCトランスポーターの基質特異性解析と薬物相互作用のハイスループット化をめざし、昆虫細胞発現系と96ウェルプレートを用いた高速スクリーニング装置を2種類開発した（ABC1のATPase活性測定装置およびABC2の形質膜ベシクル輸送活性測定装置）。そして、ABC1のATPase活性測定データを基に、Chemical Fragmentation Codesを用いた構造活性相関の定量的解析をおこなった。さらに、ヒトABCトランスポーター49種類の全遺伝子について、転写開始点より5kb上流のプロモーター解析を行い、その結果をウェブ(<http://www.humanABC.bio.titech.ac.jp>)で一般公開した。

A. 研究目的

薬物代謝物を迅速に細胞外へ排泄することは、薬物の副作用を低下させる上で非常に重要である。またさらに薬物トランスポート過程での薬物相互作用や薬物による遺伝子発現誘導を回避する分子デザインも創薬戦略の1つであると考えられる。近年になって、数多くの薬物トランスポーターが小腸や腎臓の上皮細胞、肝細胞、脳血管内皮細胞に発現し、薬物の輸送に関与していることが明らかになってきた。薬物トランスポートの基質特異性とその薬物動態上の意義を定量的に解析する事は、ポストゲノム時代における合理的な創薬分子設計戦略と副作用の低下（安全性の向上）に大きく貢献するものと考えられる。

本研究プロジェクトにおいて我々は、薬物トランスポートの観点から薬物の副作用を予測する技術を開発することに目標をおく。具体的には

- (1) 薬物輸送に関与するヒトABCトランスポーターの基質特異性スクリーニングを構築する。
- (2) 既存の医薬品および化学物質に対するABCトランスポートの基質特異性をデータベース化し、薬物相互作用の予測プログラムを開発する。
- (3) ヒト組織に特異的に発現するABCトランスポートの定量的発現プロファイリングを行う。
- (4) ヒトゲノムデータに基づきABCトランスポート遺伝子の5'-プロモーター領域の解析を行い、核内受容体を含む転写制御因子を予測する。

(5) 転写領域の解析と発現プロファイリングに基づき、ヒト組織における薬物相互作用を予測する。

B. 研究方法

ABC1 (P-糖蛋白質/MDR1)の基質特異性の構造活性相関解析

我々が開発した96wellプレート高速スクリーニング系を用いて、ABC1 (P-糖蛋白質/MDR1)の基質特異性の構造活性相関を解析した。具体的には、ヒトABC1の発現したSf9細胞形質膜画分を試験化合物とMgATPとともに30分間反応させて、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。そのデータを基に、Chemical Fragmentation Codesを用いた構造活性相関の定量的解析をおこなった。そのためにまず、試験化合物の構造式をMarkush TOPFRAG ver3.1に入力し、Chemical Fragmentation Codesを発生させた。Chemical Fragmentation Codesは構成元素、環構造、官能基、環と環の結合や炭素鎖を表すグループで構成されており、Markush TOPFRAGではこれらに加え、入力構造に含まれない部分を指定するためのNegation CODEが付与される。試験化合物濃度10 μMにおけるATPaseの阻害活性（ペラパミルに対する比活性）を目的変数とし、ケミカルフラグメ

ントコードの有無をダミー変数として線形重回帰を行った。

ABCG2 (BCRP)における薬物相互作用解析 高速スクリーニング装置開発

ヒトABCG2 cDNAをPCRによりクローニングし、pFastBacベクターに組み込んだ。次いでそのベクターから発現用バキュロウイルスを作成し、Sf9昆虫細胞にウイルスを感染させてABCG2タンパク質を発現させた。ABCG2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。その細胞から形質膜ベシクルを調製して、³Hラベルした抗癌剤メソトレキセートの輸送能力を指標にして、ABCG2における薬物相互作用を調べた。ABCG2によるATP-依存性メソトレキセートの輸送能力と薬物相互作用を効率良く測定するために、高速スクリーニング装置を開発した。またさらに、抗癌剤イリノテカン(CPT-11)の活性代謝物であるSN-38およびその誘導体のヒトABCG2による膜輸送を測定し、天然フラボノイドとの薬物相互作用を検討した。

ヒトABCトランスポーター遺伝子のプロモーター解析

公開されているゲノム情報とTRANSFACプログラムを用いて、ヒトABCトランスポーター49種類の全遺伝子について、転写開始点より5kb上流のプロモーター解析を行い、その結果をウェブ (<http://www.humanABC.bio.titech.ac.jp>) で一般公開した。

C. 研究結果

ABCB1 (P-糖蛋白質/MDR1)の基質特異性の構造活性相関解析

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。その結果、Caチャンネル阻害剤に対して高い基質特異性が認められ、次いで免疫抑制剤であるFK506、抗癌剤ノタキソール、エトポシドが中程度の活性を示した。Caチャンネル阻害剤に高い基質特異性がある理由は、血液脳関門においてABCB1 (P-糖蛋白質) が、Caチャンネル阻害剤の脳への移行を制限して、中枢神経への副作用を抑止しているものと考えられる。特にCaチャンネル阻害剤において、ニフェジピンとニカルジピンはどちらもジヒロピリジン環を有するが、それらのATPase活性には大きな差が認められた。ニフェジピンではジヒロピリジン環内のアミン基

付近にHOMOに集中している一方、ニカルジピンではジヒロピリジン環に結合する側鎖のアミン基付近に局在している。その他のATPase活性が認められたCaチャンネル阻害剤においても、アミン基やチオール基といったヘテロ元素の付近にHOMOが局在していることが解った。ABCB1の基質特異性のプロファイリングデータを基に、Chemical Fragmentation Codesによる構造活性相関の定量的解析をおこなった結果、炭素鎖で連結された芳香族環の存在が重要であることが示唆された。

ヒトABCトランスポーター遺伝子のプロモーター解析

公開されているゲノム情報とTRANSFACプログラムを用いて、ヒトABCトランスポーター49種類の全遺伝子について、転写開始点より5kb上流のプロモーター解析を行った。その結果をウェブ (<http://www.humanABC.bio.titech.ac.jp>) で一般公開した。一例として、ABCG2遺伝子2 kb上流域にAML-1a, AP-1, GATA等の結合部位が数多くヒットした。このことは、乳ガン細胞に薬剤耐性を付与するABCG2の発現は多くの造血系幹細胞でも見出されている事実と相関して、非常に興味深い。

D. 考察

ABCB1 (P-糖蛋白質/MDR1)の基質特異性の構造活性相関解析

ABCB1の基質特異性と相関性のよいChemical Fragmentation Codesの組み合わせを選択することができた。Chemical Fragmentation CodesはDerwent社が作成している特許データベースの化合物に対して1963年からインデキシングされており、STN、DIALOG、Delphonなどのデータベースシステムにおいて特許記載の構造を選択する検索式として用いられている。今回得られた結果ではモデル解析に使用した基質化合物の分子量やLogPなど他のパラメータを使用しておらず、得られたChemical Fragmentation Codesの組み合わせ結果はABCB1の基質特異性を考慮したデータベースの検索式として利用することができる。

また、Caチャンネル阻害剤において、アミン基やチオール基といったヘテロ元素の付近にHOMOが局在していることが解った。このようなHOMOの局在が、P-糖蛋白質分子の中で、どのアミノ酸残基と相互作用するのか興味深い。また、もしそのアミノ酸残基がSNPによって他のアミノ酸残基に変異した場合、ABCB1の機能に大きな変化の起ることが予想される。今後、薬物トランスポーターの遺伝子多型と薬の分子軌道計算との融合研究は、

創薬分子デザインおよび薬物相互作用の予測において重要なアプローチになるものと推察される。

ABCG2 (BCRP)における薬物相互作用解析 高速スクリーニング装置開発

本プロジェクトにおいて、我々は96穴マルチスクリーンを用いた高速スクリーニング装置を開発した。ABCG2による薬物輸送および薬物相互作用の測定に応用した結果、測定は約10倍スピードアップした。また、天然フラボノイド・ライブラリーを用いて、メソトレキセート輸送に対する阻害スクリーニングを行った結果、ケルセチンとテアフラビンが強い阻害剤であることが判明した。このことは、これらフラボノイドは、ABCG2による薬物輸送と相互作用することが示唆される。今後、既存の医薬品ライブラリーを用いて薬物相互作用のスクリーニングを行い、構造活性相関のデータベースを構築する計画である。

ヒトABCトランスポーター遺伝子のプロモーター解析

薬物体内動態におけるABCトランスポーターの役割を評価する際、ABCトランスポーターそれぞれの基質特異性、組織・器官特異的発現レベルおよび遺伝子発現調節などを包括的に解析することが重要である。これまでの研究で、遺伝子の発現調節には転写開始上流のプロモーター領域およびスプライシング制御が深く関わっていることが示されている。転写開始上流のプロモーター領域にはDNA結合ドメインと転写活性化制御ドメインがあり、この部位に転写因子は時期・組織特異的に作用しトランスポーターの発現を調節していると考えられる。

ヒトABCトランスポーター遺伝子のプロモーター領域に関する解析結果をデータベース化することにより、薬物によるABCトランスポーターの発現制御（誘導・抑制）の解明への基盤を構築した。しかし、ヒットした転写因子の中には偽陽性のもの（ノイズ）が多数含まれていると考えられる。これらは本物の転写因子との区別が難しく、これらを如何にして省いていくかがこれからの課題である。それを解決する方法としては、同じような発現プロファイルを示すトランスポーターに関して、これらのプロモーター解析結果を比較することで相当する転写因子を抽出できれば、偽陽性のヒットをある程度落とすことができるだろう。また様々な解析アルゴリズムを試してみ、類似のヒットを示すものは本物の転写因子である可能性が高い。

E. 結論

本年度において、我々は薬物トランスポーター基質特異性スクリーニング装置（2種類）を完成した。また、Chemical Fragmentation CodesによるABCB1 (P-糖蛋白質/MDR1)の基質特異性の構造活性相関解析を可能にした。これにより、薬物相互作用を予測する技術的基盤が構築された。今後、既存の医薬品および化学物質ライブラリーを用いて、基質特異性および薬物相互作用を測定し、データベースを構築する計画である。一方、ヒトABCトランスポーター遺伝子のプロモーター解析においては、核内受容体の結合部位を解析する計画である。そして、油谷グループの発現プロファイリング、および中田グループの核内受容体と医薬品相互作用データとリンクさせて、薬物相互作用データベースの充実を図るつもりである。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

- Mitomo, H, Kasamatsu, S, Ito, K., Ikegami, Y, **Ishikawa, T.** A functional study on the polymorphism of ATP-binding cassette transporter ABCG2 Critical role of Arg-482 in Methotrexate transport *Biochem J*, 373, 767-774, 2003
- Shimizu, H, Taniguchi, H, Hippou, Y, Yashizaki, Y, Aburatani, H and **Ishikawa, T.** Characterization of mouse Abcc12 gene and its transcript encoding an ATP-binding cassette transporter, an orthologue to human ABCC12 *Gene*, 310, 17-28, 2003
- **Ishikawa, T.**, Kasamatsu, S, Hagiwara, Y, Mitomo, H, Kato, R, and Sumino, Y Expression and Functional Characterization of Human ABC Transporter ABCG2 Variants in Insect Cells *Drug Metabol and Pharmacokin.*, 18, 194-202, 2003
- Takayanagi, S, **Ishikawa, T.**, Molecular Identification and Characterization of Rat Abcc1 cDNA Existence of two splicing variants and species difference *J of Exp Ther and Oncol*, 3, 136-146, 2003
- Sano, K., Yoshikawa, M, Hayakawa, S, Ikegami, Y, Yoshida, H, **Ishikawa, T.**, Sawada, S, and Tanabe, S Simple non-ion-paired high performance liquid chromatographic method for simultaneous quantification of carboxylate and

lactone forms of 14 new camptothecin derivatives
J Chromatogr B, 795, 25-34, 2003

- Omshu, Y, Hirano, H, Nakata, K., Oosumi, K., Nagakura, M, Tarui, S and **Ishikawa, T.** High-speed screening and structure-activity relationship analysis for the substrate specificity of P-glycoprotein (ABCB1) Chem-Bio Informatics J, 3, 175-193, 2003
- Satoh, T, Baba, M, Nakatsuka, D, Ishikawa, Y, Aburatani, H, Furuta, K., **Ishikawa, T.**, Hatanaka, H, Suzuki, M and Watanabe, Y Role of heme oxygenase-1 protein in the neuroprotective effects of cyclopentenone prostaglandin derivatives under oxidative stress Eur J Neurosci 17 2249-2255 2003

総説

- **Ishikawa, T.** Multidrug Resistance Genetics of ABC Transporters In “Encyclopedia of Human Genome”, Nature Publishing Group, 4, 154-160, 2003
- 石川智久、清水秀忠、高柳晋一郎、北島正人 ヒトABCトランスポーター 新規遺伝子の探索とSNP機能解析、Bioベンチャー3<3>, 96-99, 2003
石川智久 トキシコゲノミクスと遺伝子多型-ゲノム創薬から個の医療に向けて 次世代ゲノム創薬(日本薬学会編) 中山書店, 157-171, 2003

著書

石川智久 ゲノム創薬と未来産業、エルゼビア・ジャパン, 2003

2. 学会発表

- 第25回 日本医学会総会 “ヒトABCトランスポーターの機能解析と創薬分子デザイン” (2003 04 04-06 福岡)
- 第7回がん分子標的治療研究会 “ヒトABCトランスポーターの機能解析に基づく創薬分子デザイン” “ヒトABCトランスポーター-ABCG2の多型における機能解析, メソトレキセート輸送における482残基アミノ酸の重要性” “Breast Cancer resistance Protein BCRP/ABCG2)変異体に対する新規CPT誘導体の影響” (2003 06 02-03 東京学術総合センター)
- JBS Bio-Frontier Symposium 2003 “Expression profiling and promoter analysis of human ABC

transporter genes” (2003 06 05-07 つくば)

- 第108回日本薬理学会関東部会 “ヒトABCトランスポーターの遺伝子多型と機能解析” (2003 06 14 幕張メッセ)
- The 5th International Workshop on Advanced Genomics “Pharmacogenomics of Human ABC Transporters ” (2003 06 26-27 パシフィコ横浜)
JBAバイオベンチャーフォーラム 第8回シンポジウム “創薬工学プラットフォーム” (2003 07 01 学士会館)
- 大田区民大学 “薬の効き方は、人それぞれのゲノムによって違う” (2003 07 02 大田区産業プラザ)
- The 2nd International Symposium on Redox Life Science “Pharmacogenomics of human ABC transporters Biological function and gene regulation” (2003 8 20-22 ニセコ東山プリンスホテル)
- 2003年CBI学会大会 “ABCG2 (BCRP)における遺伝子多型の機能解析” “P-糖タンパク質 (ABCB1)における遺伝子多型の機能解析” “P-糖タンパク質の基質特異性解析用HTS” “ケミカルフラグメントコードを用いた構造-P糖蛋白質基質性の相関解析” (2003 09 17-19 こまばエミナース)
- 日本農芸化学会関西支部中部支部合同支部大会シンポジウム “ヒトABCトランスポーター機能解析からゲノム創薬バイオテクノロジー・クラスター形成へ” (2003 10 04 京都ばるるプラザ)
- 第18回日本薬物動態学会年会 “ヒトABCトランスポーター-ABCG2における多型の機能解析 メソトレキセート輸送における482残基アミノ酸の重要性” “ヒトABCトランスポーター-ABCB1とABCG2のSNP機能解析” “ABCG2変異株の機能とSN-38耐性” (2003 10 08-10 札幌プリンスホテル 国際館パミール)
バイオフォーラム2003大阪 “創薬の新しいアプローチ 機能性食品とヒトABCトランスポーター” (2003 10 22-24 インテックス大阪)
- 第6回 科学技術の新展開に関する研究会 “ゲノム創薬と未来産業 バイオテクノロジー・ビジネスクラスターの形成へ” (2003 11 06 産業創造研究所)

- ・ The 6th Conference of Asia-Pacific International Molecular Biology Network(A-IMBN) Dramatic Movement of Life Science Now to Future “ Human ABC Transporters, From Genomic Analysis to Database Construction , Functional Screening, and Drug Molecular Design” (2003 11 12-13 東京 日本科学未来館)
 - ・ PSC共同研究成果発表会 “ABCB1(P-gp)と ABCG2 (BCRP) の遺伝子多型と機能解析” (2003 12 09 日本薬学会館 長井記念ホール)
 - ・ 吸収性評価検討会主催講演会 “High-Speed Screening and Structure-Activity-Relationship Analysis for ABC Transporters Application to Pharmacogenomics of ABCB1(P-gp) and ABCG2(BCRP) ” (2003 12 09-10 長浜ロイヤルホテル)
 - ・ 学術創成シンポジウム第5回 “薬物輸送機構に基づく新規抗癌剤の分子デザイン トランスポーターの高速スクリーニング系構築からデータ解析まで” (2004 01 07-08 ぱるるプラザ岐阜)
 - ・ 第18回冬季札幌がんセミナー “癌の薬剤耐性と薬物トランスポーターの遺伝子多型” (2004 02 07-08 ロイトン札幌)
 - ・ 創薬バイオテクノロジー2004 “ヒトABCトランスポーター遺伝多型と基質特異性解析スクリーニング” (2004 02 18-19 ホテルイースト2 1 東京)
 - ・ 第19回研究者セミナー “ゲノム創薬と未来産業” (2004 03 02 科学技術振興機構 東京本部)
- H 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)
- 1 特許取得
なし
 - 2 実用新案登録
なし
 - 3 その他
なし

Chemical Fragmentation Codesを用いた 構造活性相関の解析

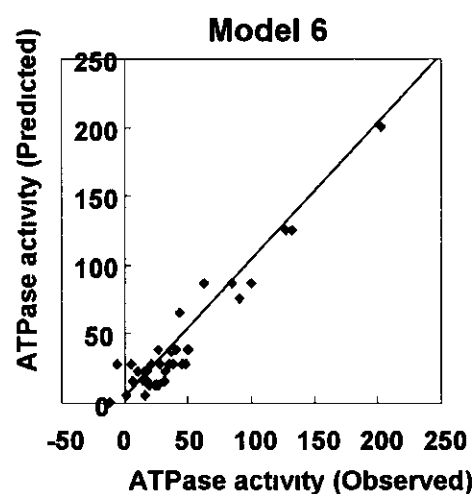
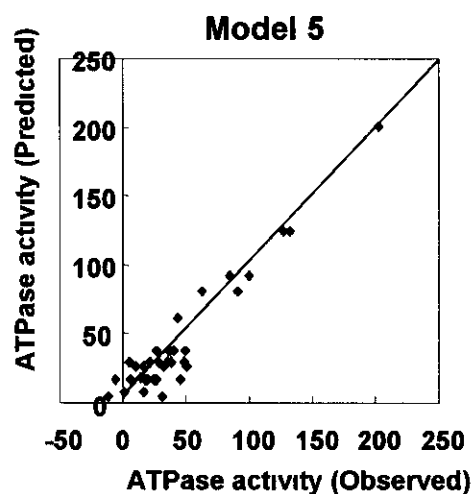
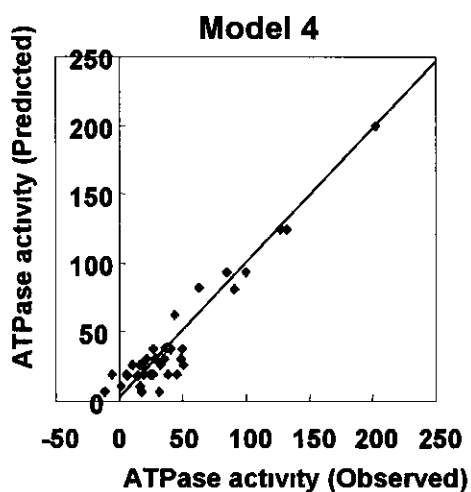
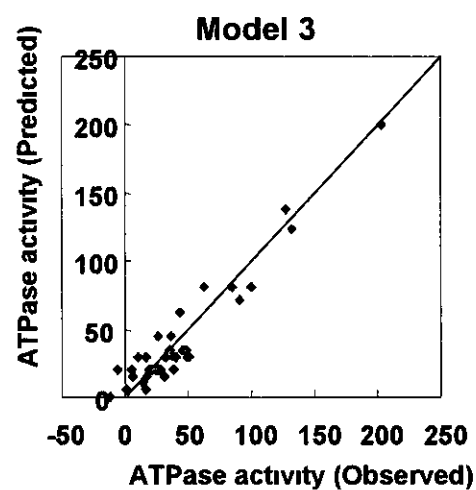
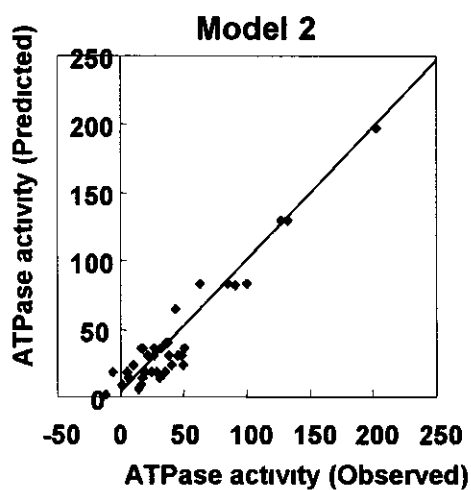
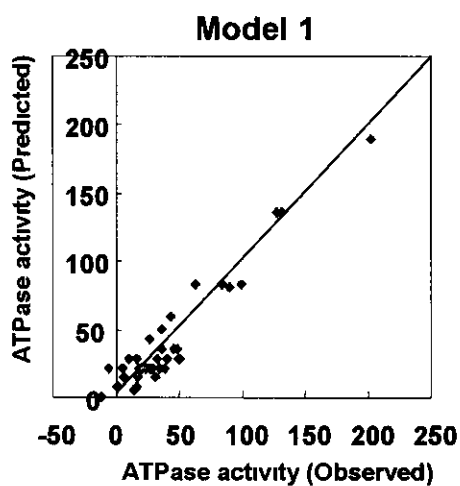


Table 1 Multiple linear regression analysis models to predict ABCB1 ATPase activity toward tested compounds

Chemical Fragmentation Code	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6
J581	96 86 (19 25)	90 10 (22 07)	90 66 (21 94)	82 85 (22 49)	84 69 (22 15)	97 03 (22 75)
G100	54 46 (12 19)	59 32 (13 11)	51 62 (12 46)	55 01 (12 32)	54 80 (12 29)	49 16 (12 80)
M331	38 42 (14 49)	46 44 (14 37)	42 30 (13 96)	42 90 (14 04)	43 67 (14 02)	37 71 (14 46)
M270	0	0	0	0	11 61 (10 53)	0
M272	0	0	0	11 40 (10 47)	0	0
M531	-61 62 (12 00)	-64 51 (12 46)	-61 04 (12 04)	-62 63 (12 18)	-63 38 (12 23)	-59 42 (11 99)
F014	-28 32 (16 03)	-22 44 (14 29)	-29 08 (16 49)	-19 80 (13 89)	-20 93 (13 98)	-22 41 (13 92)
H100	0	0	0	0	0	-15 64 (12 70)
M321	0	0	-14 59 (12 76)	0	0	0
M370	0	-12 56 (11 57)	0	0	0	0
M391	-14 29 (12 29)	0	0	0	0	0
Constant	43 44 (13 75)	36 61 (10 31)	45 01 (14 97)	26 99 (9 94)	26 40 (10 13)	38 79 (10 77)
R =	0 953	0 952	0 953	0 952	0 952	0 954
s =	14 38	14 53	14 42	14 53	14 50	14 24
F =	47 85	46 78	47 58	46 81	47 01	48 90

The ABCB1 ATPase activity is formulated as a linear combination of chemical fragmentation codes weighted by the corresponding coefficient, where the symbol of “*i*” in the parentheses designates a specific chemical fragmentation code

ABCB1 ATPase activity (Predicted) = $\sum C(i) \times \text{Chem Frag Code } (i) + \text{Constant}$ R correlation coefficient, s standard deviation, F Fisher value (level of statistical significance)

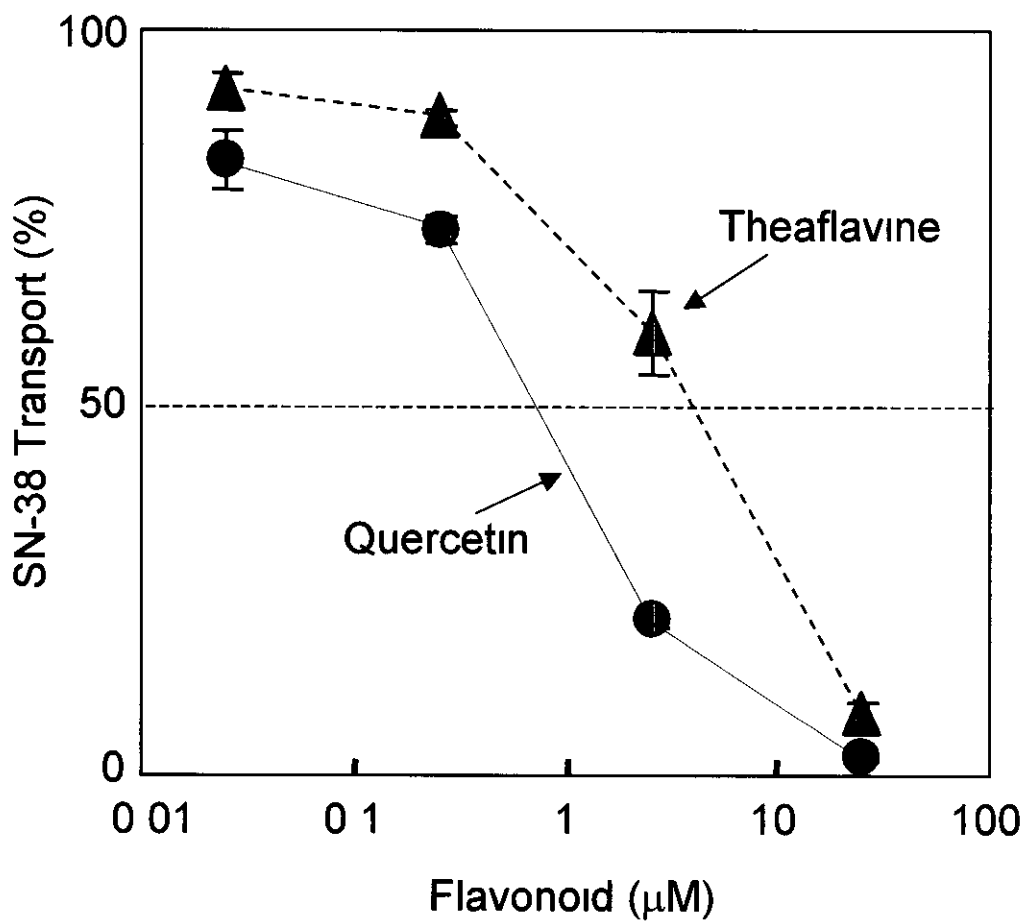
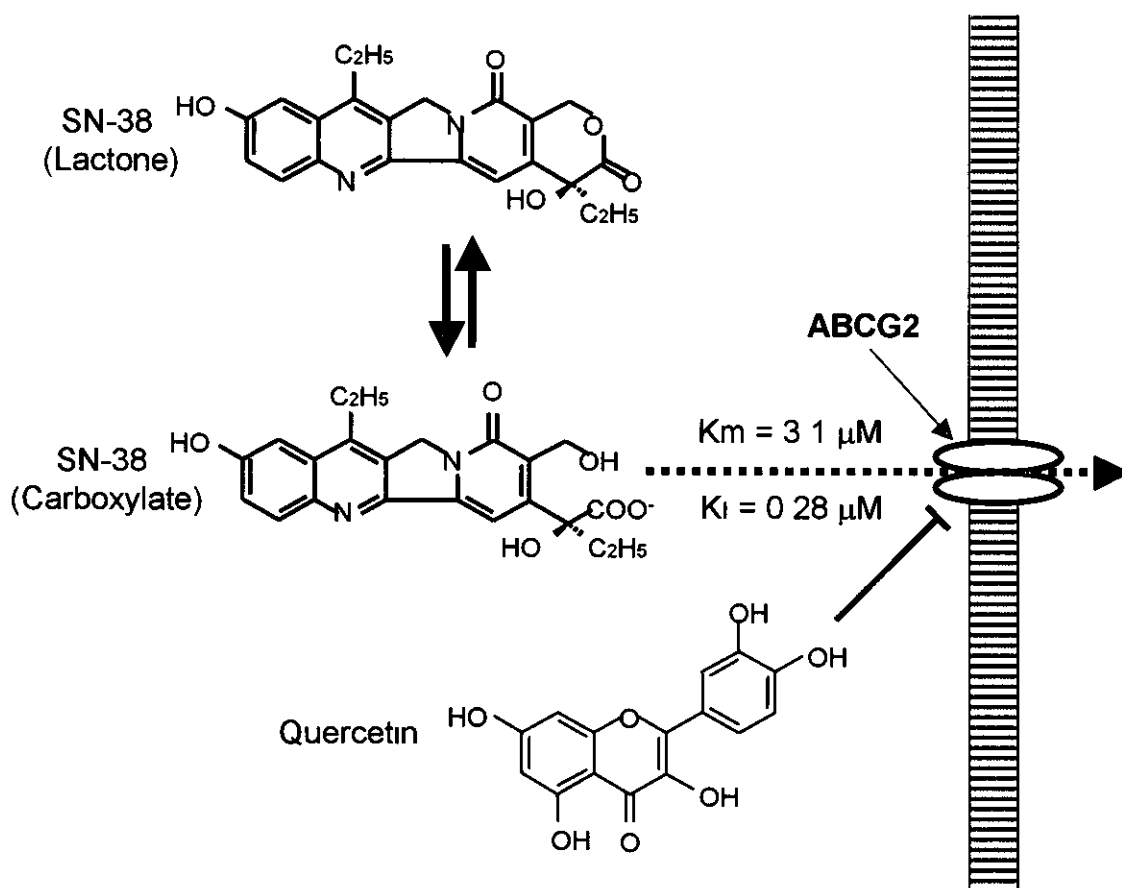
Table 2 Explanation for the chemical fragmentation codes used for the prediction of the ABCB1 ATPase activity

Chemical Fragmentation Code		Ext Code	Explanation
J58	Oxo group bonded to aliphatic C	J581	One oxo group bonded to aliphatic C
G1	Unfused aromatic rings	G100	Unfused aromatic ring(s) present, no other carbocyclic ring systems are present
M33	Straight or branched carbon chains	M331	Straight Carbon chain with -CH ₃ , -C=CH ₂ , and/or -C≡CH
M27	Chain bonded to U	M270	Chain bonded to U
M27	Chain bonded to U	M272	Chain bonded to O
M53	Carbocyclic systems with at least one aromatic ring	M531	One M53 code
F01	Positions substituted	F014	Position 4 substituted
H10	Type of amine	H100	One primary amine
M32	Multipliers for Subset M31 M31 Number of C atoms in polyvalent chain	G321	One or more M31 code used once
M37	Carbon chain bonded to ring C and (U and/or C=U and/or C≡CH) but not V, C=V, C≡V	M370	Carbon chain bonded to ring C and (U and/or C=U and/or C≡CH) but not V, C=V, C≡V
M39	Multipliers for codes M350 to M383 (polyvalent carbon chain attachments)	M391	One or more of codes used once

U= C,H,O,S,Se,Te or N

V=atom other than U

ABCG2における薬物相互作用



厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進等研究事業）
分担研究報告書

ABC トランスポーターの遺伝子発現プロファイリング

分担研究者 油谷浩幸（東京大学国際・産学共同研究センター教授）

研究要旨

トキシコゲノミクスの手法として注目されているマイクロアレイ解析を用いて下記2項目の検討を行った。

- 1) 薬物を投与したラット肝からの遺伝子発現プロファイルを時系列データについて、決定木を含むマイニング手法について検討した。
- 2) アセトアミノフェン投与 48 時間後のラット肝臓において、0.3g/kg で発現低下したのは Abcg5、2.0g/kg で発現低下は Abcb11、Abcc2、Abcc6 の3 遺伝子、Abcc3 は増加していた。

A.研究目的

薬物代謝物を迅速に細胞外へ排泄することは、薬物の副作用を低下させる上で非常に重要である。またさらに薬物トランスポート課程での薬物相互作用や薬物による遺伝子発現誘導を回避する分子デザインも創薬戦略の1つであると考えられる。近年になって、数多くの薬物トランスポーターが各組織で発現し、薬物の輸送に関与していることが明らかになってきた。本研究は、薬物トランスポーターの発現変動に注目し、薬物の副作用を予測する技術を開発することに目標をおく。

トキシコゲノミクスの手法として注目されているマイクロアレイ解析について、時系列データの解析アルゴリズムについての検討も進めた。

B.研究方法

1 薬物投与後時系列データの解析アルゴリズムの開発

DNA マイクロアレイの実験で得られるデータを解析する方法には、様々なものが提案されているが、そのほとんどは時系列データを解析するには不向きなものである。この点を克服するため、決定木を用いた解析手法を考案した。決定木を使った方法は、木を生成する段階でデータをモデル化し、出来た木を使って未知の値の属性を予測することも可能である。現在は、時系列データの特性を解析に生かしきれていないが、比較的簡単な改良で時系列データの解析に応用できると考えている。

決定木を用いたデータマイニングの方法を説明

する。図1は6つの化合物AからFを分類した結果、生成される決定木を模式的に示したものである。それぞれの化合物ごとに、DNA マイクロアレイの実験結果が、1,3,14 日目の3点であるとする。また、化合物ごとに発ガン性や遺伝毒性の有無といった情報もそろっているものとし、木を生成する過程は、再帰的に行われる。1つの親ノードを二つの子ノードに分割するとき、どの条件（どの遺伝子の何日目の発現値）を用いるのが最適かをまず計算する。直感的には、発ガン性のあるなどの属性値がきれいに分けられるような条件がよい。図では、分類に使った Probe set（遺伝子）とその境界値が書き込まれている。この良さの定義には様々なものが用いられているが、今回は情報量エントロピーを使った基本的な定義を用いた。親ノード（Parent）を二つの子ノード（ C_A, C_B ）に分割する場合を

$$\Delta I = I(P) - P(C_A)I(C_A) - P(C_B)I(C_B)$$

考える。分割の良さ ΔI の定義を以下のようなものとする。

I は情報量エントロピーを表す。親ノードに10個の化合物データがある場合、発ガン性のある化合物が4つ、ないものが6つだったとき、このノードのエントロピーは、下記の式で、計算

$$I(P) = -\frac{4}{10} \log\left(\frac{4}{10}\right) - \frac{6}{10} \log\left(\frac{6}{10}\right)$$

される。