

研究要旨 薬物トランスポーターの遺伝子発現量の多様性について、不死化リンパ球および末梢血由来の RNA をマイクロアレイ解析することにより検討した。ABCA1 や ABCB1 遺伝子は発現値の CV 値が大きく発現の個人差が示唆された。

#### A. 研究目的

トランスポーター遺伝子の遺伝子多型と血中薬剤濃度との関連についての報告が近年散見されるが、遺伝子多型には蛋白質配列の変異を伴わないものも多くその意義付けはなかなか困難である。本研究においてはアレル特異的な遺伝子発現の多様性の有無について解析することを目的とする。本年は特に遺伝子発現量にどの程度のばらつきがみられるかについて不死化リンパ球及び末梢血検体を用いてマイクロアレイ解析を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. ABC トランスポーター遺伝子の発現プロフィール

トランスポーター遺伝子の発現量にどの程度の個人差があるかどうかを検討するために、EBVを用いて不死化したリンパ球17株の発現プロフィールを解析した。5 $\mu$ gの全RNAより合成したcDNAを鋳型としてcRNAを増幅する際にBiotin-11-UTPを用いて標識し、CodeLink ヒト10Kアレイ (Amersham) を用いて1万遺伝子の発現プロフィールを解析した。cRNAの合成は、CodeLink Expression Bioarray System (Amersham) のプロトコールにしたがって行った。ハイブリダイゼーション効率を高めるために10 $\mu$ gのcRNAの断片化を行い、300 rpmで高速回転させながら、37 $^{\circ}$ Cで18時間ハイブリダイゼーションを行った。洗滌後、蛍光強度の測定にはAgilent社の共焦点スキャナーを使用した。得られたシグナル値については、CV値 (=標準偏差/平均値) によりばらつきを評価した。

##### 2. 末梢血における ABC トランスポーター遺伝子の発現

13名の患者末梢血全血から抽出した全RNAから合成・Biotin標識したcRNAをアレイ解析に使用した。CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray (Amersham)を用

いて2万遺伝子の発現を解析した。アレイ解析は上記と同様に行った。

#### (倫理面への配慮)

本年度の研究計画ではヒトゲノムのゲノタイプピングは施行しない。なおEBVにより不死化したリンパ球株は徳島大学医学部公衆衛生学教室より分与を受けたもので連結不能匿名化されているものである。

#### C. 研究結果

##### 1. ABC トランスポーター遺伝子の発現プロフィール

発現強度についてはアレイ全体からの蛍光強度を一定とすることにより標準化を行った。22種類のABCトランスポーター遺伝子について遺伝子発現データが得られた。発現強度(平均値)は0.123(ABCC2)から24.426(ABCE1)まで分布しており、CV値も0.151(ABCB6:最小値1.164-最大値2.177)から0.557(ABCA1:最小値0.073-最大値0.676)や0.657(ABCB1, MDR1:最小値0.312-最大値1.491)と遺伝子により変動幅が異なっていた(表1)。個人による発現量の変動については図1にまとめた。

##### 2. 末梢血における ABC トランスポーター遺伝子の発現

13名の患者末梢血の発現プロフィールを解析した。ABCB10、ABCB11、ABCE1の3つの遺伝子は発現値の平均が1以上であり、かつCV値が0.4を越えている遺伝子であった。不死化リンパ球における発現値のばらつきの結果とは必ずしも一致していなかった。

#### D. 考察

ABCB1 や ABCC2 のように既に DNA 多型との関連が報告されている遺伝子については、来年度以降タイプピング情報との関連を検討する必要がある。発現プロフィールの解析例数をさらに増やし、発現レベルの変動と相関するような DNA レベルでの多様

性の有無について今後さらに検討したい。具体的には研究班内の共同研究としてトランスporter遺伝子のゲノム領域、とりわけプロモーター領域に存在するDNA多型についてタイピングを行い、発現レベルとの相関、さらには薬物刺激による発現変動がどうかについて検討を進める予定である。本年はリンパ球あるいは末梢血を用いて解析を行ったが、腸管や肝臓などの薬物動態を制御する主要臓器や腫瘍細胞などでの発現にもジェノタイプによる発現量の違いがあるかどうかについて検討を進める必要がある。

トランスporter遺伝子が多数のエクソンから構成されることからスプライシング変異が多様な転写産物をもたらす。次年度以降にはゲノムタイリングアレイを用いて変異転写産物の多様性についての検討も行う予定である。

#### E. 結論

ABCA1 や ABCB1 遺伝子は発現値にばらつきが高く、発現量に個人差のある可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ge X, Tsutsumi S, Aburatani H, Iwata S. Reducing false positives in molecular pattern recognition. *Genome Informatics* 14:34-43, 2003
- 2) 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
- 3) 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
- 4) Shimizu H, Taniguchi H, Hippo Y, Hayashizaki Y, Aburatani H, Ishikawa T. Characterization of the mouse Abcc12 gene and its transcript encoding an ATP-binding cassette transporter, an orthologue of

human ABCC12. *Gene.* 310:17-28. 2003

- 5) Fujiwara Y, Yokoyama M, Sawada R, Seyama Y, Ishii 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
- 6) 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

#### 総説

1. 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

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

#### 2. 学会発表

1. 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
2. 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
3. 第5回国際ゲノム会議（横浜）6/27 Transcriptome to Integrated Biology
4. 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
5. 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 ABC トランスポーター22 遺伝子の発現プロファイル

gene	ACCN#	mean±SD	C.V.	Min-Max
ABCB1	NM_000927	0.248±0.163	0.657	0.073-0.676
ABCA1	NM_000350	0.494±0.275	0.557	0.312-1.491
ABCC2	NM_000392	0.123±0.058	0.476	0.058-0.305
ABCA7	NM_033308	0.352±0.149	0.423	0.157-0.685
ABCB7	NM_004299	8.665±3.229	0.373	4.912-16.195
ABCD1	NM_000033	2.885±1.037	0.359	1.672-4.723
ABCC3	NM_020038	0.200±0.071	0.354	0.077-0.343
ABCE1	NM_002940	24.426±8.504	0.348	12.590-42.777
ABCF1	NM_001090	9.314±3.086	0.331	5.390-17.796
ABCA3	NM_001089	0.192±0.062	0.324	0.119-0.333
ABCD2	NM_005164	0.141±0.044	0.312	0.077-0.215
ABCC8	NM_000352	0.944±0.291	0.308	0.385-1.613
ABCB6	NM_005689	3.140±0.936	0.298	1.584-5.124
ABCG5	NM_022436	0.160±0.047	0.295	0.048-0.226
ABCB10	NM_012089	1.003±0.276	0.276	0.697-1.904
ABCB11	NM_003742	0.197±0.046	0.233	0.105-0.291
ABCC1	NM_019902	1.500±0.344	0.230	1.172-2.704
ABCD4	NM_020326	0.744±0.162	0.218	0.335-0.894
ABCD3	NM_002858	5.295±1.052	0.199	3.950-7.100
ABCG1	NM_016818	2.310±0.456	0.197	1.446-3.142
ABCC5	NM_005688	1.106±0.197	0.178	0.610-1.523
ABCB6	NM_005689	1.641±0.249	0.151	1.164-2.177

図1 リンパ球細胞株にける ABC トランスポーター遺伝子の発現の個人差

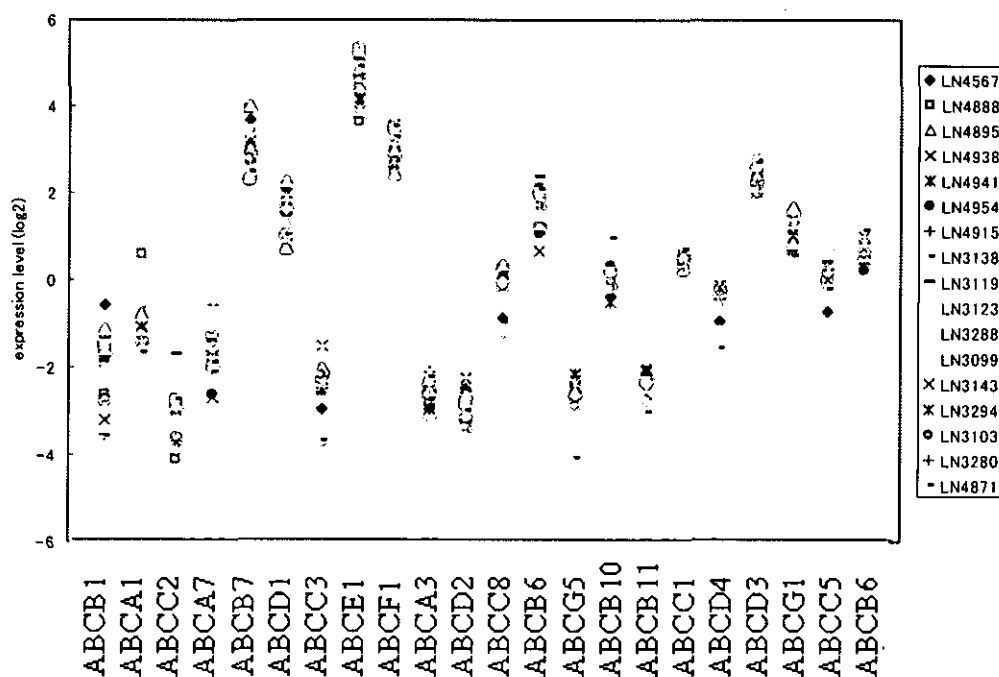


表2 患者末梢血におけるトランス  
ポーター遺伝子の発現

Gene Symbol	mean±SD	CV
ABCD1	7.2±1.7	0.24
CABC1	5.46±1.42	0.26
ABCC11	5.33±1.56	0.29
ABCA7	4.89±1.47	0.30
ABCF1	4.64±0.9	0.19
ABCC5	4.12±0.88	0.21
ABCB10	4.02±1.66	0.41
ABCC10	3.92±0.73	0.19
ABCG4	3.78±0.66	0.17
ABCA7	3.4±0.96	0.28
ABCE1	2.5±1.36	0.54
ABCG2	2.5±0.51	0.20
ABCD4	2.04±0.34	0.17
ABCB11	2.02±0.95	0.47
ABCF3	16.84±2.24	0.13
ABCC8	12.1±3.69	0.30
ABCF2	11.08±3	0.27
ABCG1	10.37±2.3	0.22
ABCB7	1.2±0.21	0.17
ABCC12	1.14±0.26	0.22
ABCD3	0.97±0.24	0.25
ABCB6	0.96±0.23	0.24
ABCC1	0.9±0.27	0.30
ABCC6	0.76±0.12	0.15
ABCC2	0.69±0.16	0.24
ABCC3	0.52±0.1	0.19
ABCA3	0.5±0.09	0.18
ABCB6	0.49±0.09	0.19
ABCB4	0.48±0.18	0.37
ABCA10	0.42±0.2	0.48
ABCA5	0.41±0.16	0.40
ABCB1	0.39±0.12	0.31
ABCC4	0.35±0.19	0.54
ABCG8	0.31±0.08	0.26
ABCC9	0.24±0.08	0.33
ABCG5	0.22±0.06	0.29
ABCB9	0.19±0.09	0.45
ABCA1	0.18±0.14	0.74
ABCB8	0.18±0.05	0.29
ABCA2	0.15±0.08	0.56
ABCA9	0.1±0.06	0.66
ABCD2	0.09±0.04	0.47
ABCA6	0.07±0.04	0.67
ABCC6	0.05±0.03	0.52
ABCA8	0.02±0.03	1.91
ABCA4	-	-

図2 発現量の個人差

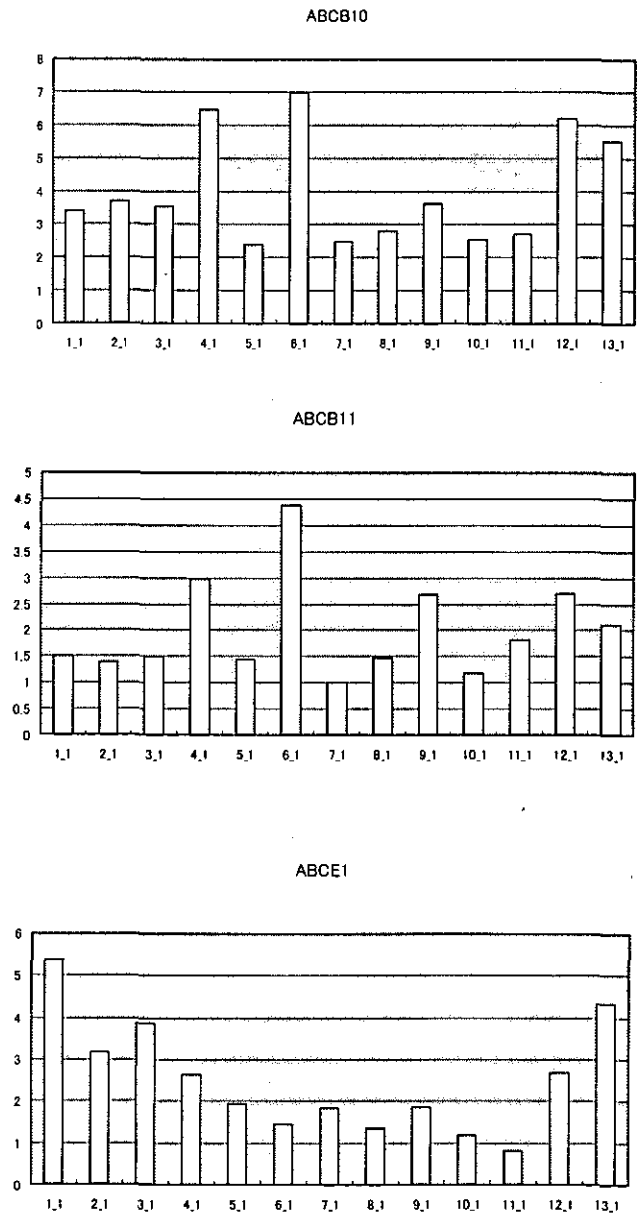
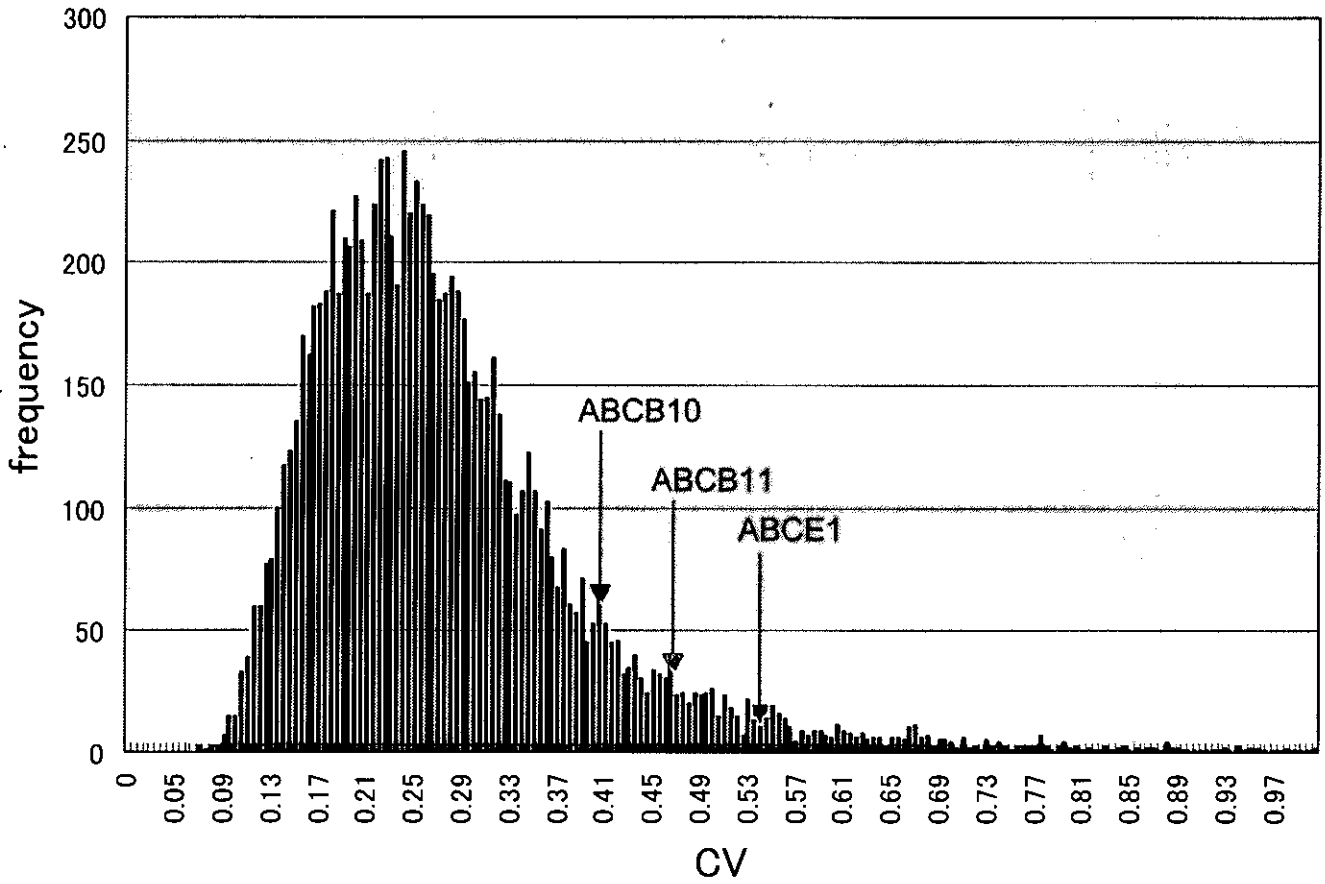


図 3



CodeLink 20K array の発現量の平均が1以上の遺伝子(10044 遺伝子)の CV 値ヒストグラムを示す

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shitara Y, Li AP, Kato Y, Lu C, Ito K, Itoh T, Sugiyama Y.	Function of uptake transporters for taurocholate and estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronide in cryopreserved human hepatocytes.	Drug Metab Pharmacokin	18	33-41	2003
Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y.	ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics.	J Biol Chem	278	22644-22649	2003
Itoda M, Saito Y, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Suzuki H, Sugiyama Y, Ozawa S, Sawada J.	Eight novel single nucleotide polymorphisms in ABCG2/BCRP in Japanese cancer patients administered irinotecan.	Drug Metab Pharmacokin	18	212-217	2003
Sugiyama D, Kusuhashi 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	43489-43495	2003
Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y.	Impact of drug transporter studies on drug discovery and development.	Pharmacol Rev	55	425-461	2003
倉智嘉久, 杉山雄一	上皮組織ベクトル輸送の分子基盤と機能制御 序論	蛋白質・核酸・酵素	48	101-104	2003
伊藤晃成, 鈴木洋史, 堀江利治, 杉山雄一	上皮組織ベクトル輸送の分子基盤と機能制御 薬物トランスポーターの局在とベクトル輸送	蛋白質・核酸・酵素	48	122-132	2003
吉末訓弘, 楠原洋之, 杉山雄一	トランスポーター研究に基づく医薬品開発	バイオサイエンスとインダストリー	61	455-460	2003
楠原洋之, 杉山雄一	Pharmacogenomics	現代医療	35	1532-1540	2003
前田和哉, 神原美由紀, 平野雅, 杉山雄一	ヒト肝臓に高発現するOATP2, OATP8の機能特性の解析と肝取り込み過程における寄与率の評価	Progress in Drug Delivery System	12	33-42	2003
平野雅, 前田和哉, 設楽悦久, 杉山雄一	新規HMG-CoA還元酵素阻害薬ピタバスタチンのヒト肝選択的な分布メカニズムの解析 —OATPファミリーの関与—	薬理と治療	31 suppl.	S-81-S-84	2003
岩井めぐみ, 鈴木洋史, 西里洋平, 家入一郎, 大坪健司, 杉山雄一	ヒト Organic Anion Transporting Polypeptide 2 (OATP2) 遺伝的多型変異体のin vitro輸送機能の解析	薬理と治療	31 suppl.	S-101-S-104	2003
岩井めぐみ, 前田和哉, 杉山雄一	遺伝子多型と抗がん剤の薬物動態(特集: 癌ゲノム薬理学)	血液・免疫・腫瘍	8	26-32	2003
Takane H, Ieiri I and Otsubo K.	Genetic polymorphism of organic anion and cation transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy.	Curr Pharmacogenomics	1	245-57	2004
Ieiri I, Takane H and Otsubo K.	The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications	Clin Pharmacokinetics	in press		,2004
Zhang X, Nakaoka T, Nishishita T, Watanabe N, Igura K, Shinomiya K, Takahashi TA, Yamashita N	Efficient adeno-associated virus mediated gene expression in human placenta-derived mesenchymal cells.	Microbiology and Immunology.	47	109-116	2003

Sato K. Yamashita N. Baba M. Matsuyama T	Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cell	Blood	101	3581-3589	2003
Sato K. Yamashita N. Yamashita N. Baba M. Matsuyama T.	Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relaps	Immunity	18	367-379	2003
Watanabe T., Akishita M., Nakaoka T., Kozaki K., Miyahara Y., He H., Ohike Y., Ogita T., Inoue S., Muramatsu M., Yamashita N., Ouchi Y	Estrogen receptor beta mediates the inhibitory effect of estradiol on vascular smooth muscle cell proliferation	Cardiovascular Research	59	734-744	2003
Nagayama H. Sato K. Morishita M. Uchimaru K. Oyaizu N. Inazawa T. Yamasaki T. Enomoto M. Nakaoka T. Nakamura T. Maekawa T. Yamamoto A. Shimada S. Saida T. Kawakami Y. Asano S. Tani K. Takahashi TA. Yamashita N.	Results of phase I clinical study using autologous tumor-lysate pulsed monocyte-derived mature dendritic cell vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2	Melanoma Research	13	1-10	2003
Watanabe T, Akishita M, He H, Miyahara Y, Nagano K, Nakaoka T, Yamashita N, Kozaki K, Ouchi Y	17beta-Estradiol inhibits cardiac fibroblast growth through both subtypes of estrogen receptor	Biochemical and Biophysical Research Communication	311	454-9	2003
Morishita M. Uchimaru K. Sato K. Yamashita S. Kanematsu T. Yamashita N.	Thyroglobulin-pulsed human monocyte-derived dendritic cells induce CD4 <sup>+</sup> T cell activation.	International Journal of Molecular Medicine	13	33-39	2004
Ge X, Tsustumi S, Aburatani H, Iwata S.	Reducing false positives in molecular pattern recognition.	Genome Informatics	14	34-43	2003
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	2249-2255	2003
Shimizu H, Taniguchi H, Hippo Y, Hayashizaki Y, Aburatani H, Ishikawa T.	Characterization of the mouse Abcc12 gene and its transcript encoding an ATP-binding cassette transporter, an orthologue of human ABCC12.	Gene	310	17-28	2003
Fujiwara Y, Yokoyama M, Sawada R, Seyama Y, Ishii 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

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
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	1428-1443	2003
油谷浩幸	ゲノム創薬とプロテオミクス	Medical Briefs in Cancer	8	10-11	2003



20030643

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。