

表 1. 発現変動のある ABC トランスポーター遺伝子

GENE	Accession	UniGene ID	CYTOBAND	C. V.	RMAD
ABCA3	NM_001089	Hs. 26630	16p13.3	0.51	0.33
ABCA6	BX647672	Hs. 195395	17q24.3	0.70	0.50
ABCA12	NM_015657	Hs. 134585	2q34-q35	1.01	0.67
ABCB1	NM_000927	Hs. 489033	7q21.1	0.59	0.35
TAP2	NM_018833	Hs. 502	6p21.3	0.41	0.33
TAP2	BM837442	Hs. 502	6p21.3	1.47	0.94
ABCB4	NM_018849	Hs. 287827	7q21.1	0.42	0.26
ABCB7	AA699620	Hs. 370480	Xq12-q13	0.49	0.36
ABCD3	NM_002858	Hs. 76781	1p22-p21	0.38	0.28
ABCD3	BQ025562	Hs. 76781	1p22-p21	1.01	0.36
ABCE1	NM_002940	Hs. 12013	4q31	0.40	0.30
ABCF2	NM_007189	Hs. 438823	7q36	0.37	0.29

図 3. 発現変動の顕著な ABC トランスポーター遺伝子の発現分布 (左) と度数分布 (右)。  
A:ABCA6、B:ABCA12、C:TAP2(ABCB3) (右図の点線は、発現分布の推測イメージ)

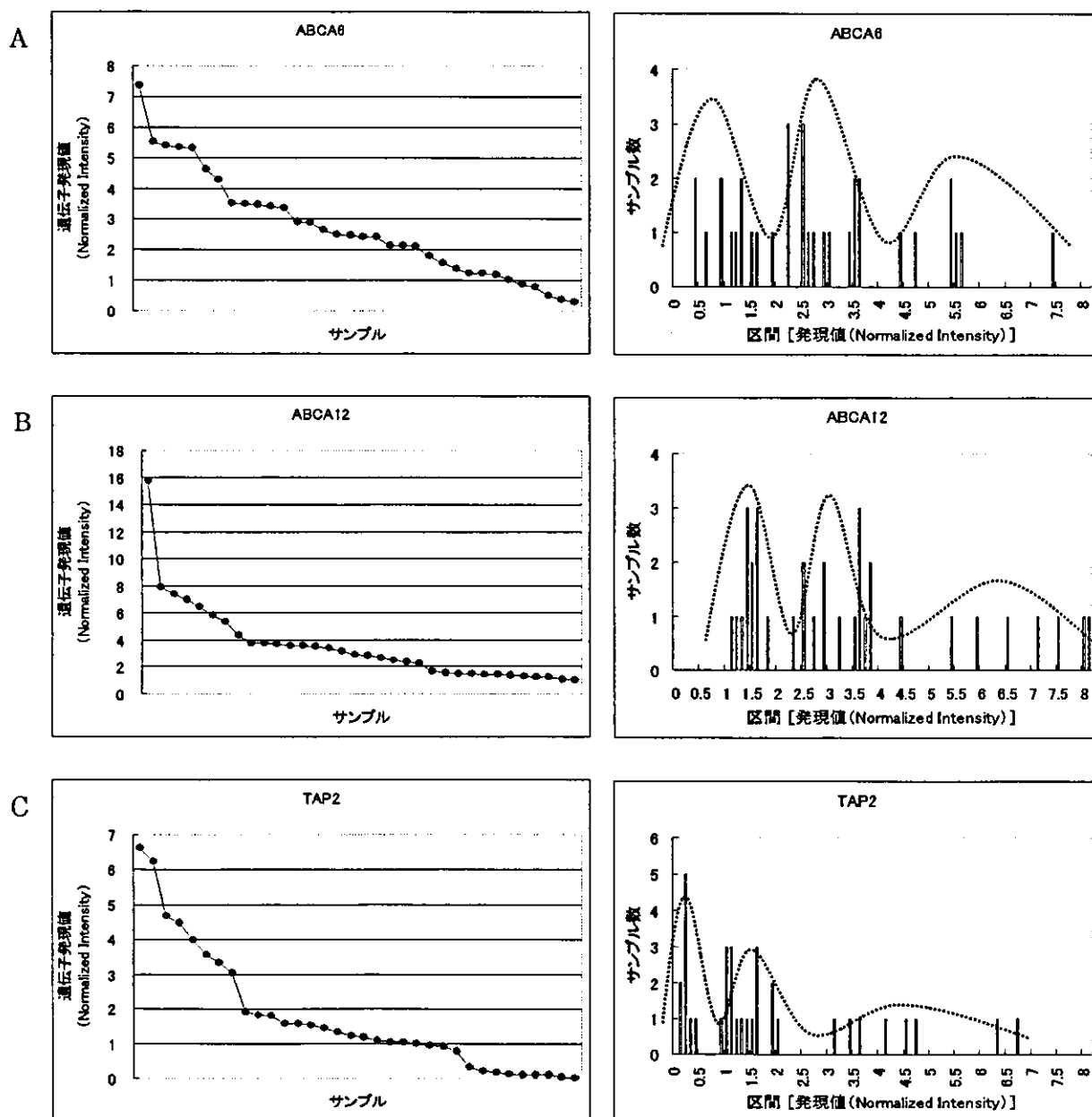
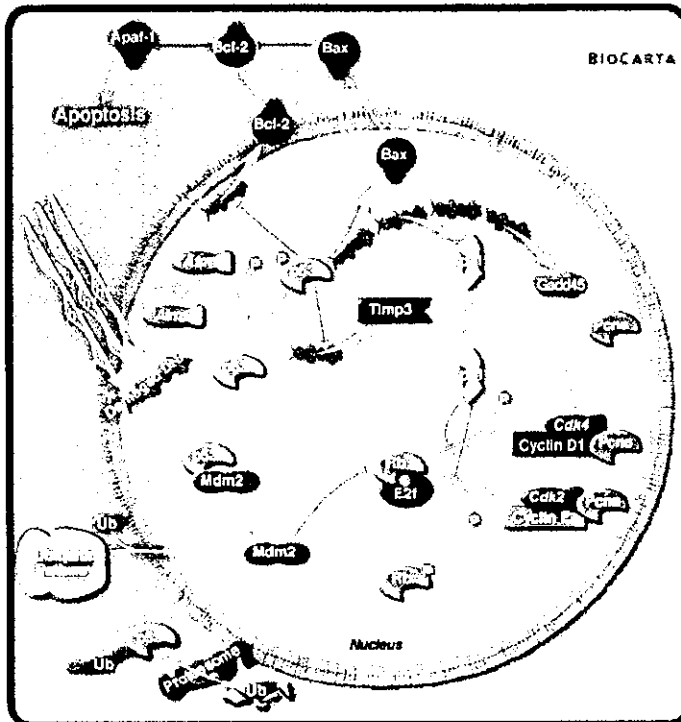


図 4 p53 シグナル経路



決定木作成の方法

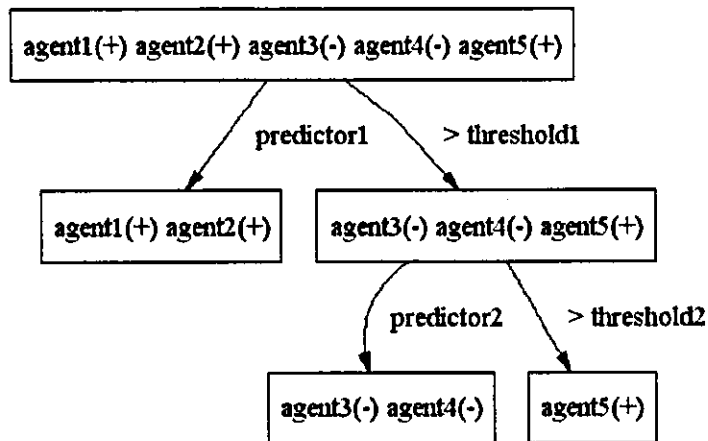


表 2 化合物の発癌性を区分するのに重要な遺伝子セット

Melanocyte Development and Pigmentation Pathway (BioCarta)
Inhibition of Matrix Metalloproteinases (BioCarta)
ATM Signaling Pathway (BioCarta)
Glucocorticoid_Mineralocorticoid_Metabolism (GenMAPP)
$\beta$ -arrestins in GPCR Desensitization (BioCarta)
Regulation of transcriptional activity by PML (BioCarta)

## II. 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

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
中田 琴子			In Silico 創薬情報	丸善出版 サービス センター	東京	2005	総ページ98
石川智久	ファーマコゲノミクス：薬物トランスポーターの遺伝子多型と薬剤応答性	村松正実	ゲノムと疾患	南山堂	東京	2004	177-186
Ishikawa, T.	Multidrug Resistance: Genetics of ABC Transporters	Cooper, D.N.	Nature Encyclopedia of the Human Genome, vol.4,	Nature Publishing Group	London	2003	154-160
石川智久			ゲノム創薬と未来産業	エルゼビア・ジャパン	東京	2003	総ページ94
辻 彰 石川智久	薬物トランスポーターと創薬	石川智久 堀江透	創薬サイエンス入門：ポストゲノム時代へのパラダイムシフト	共立出版	東京	2002	119-143
Ishikawa, T. and Yoshikawa, M.	ABC transporters: a new approach to toxicogenomics	T. Inoue, W. D. Pennie	Toxicogenomics,	Springer-Verlag	Tokyo	2003	109-114
石川智久	トキシコゲノミクスと遺伝子多型-ゲノム創薬から個別の医療に向けて	日本薬学会	次世代ゲノム創薬	中山書店	東京	2003	157-171
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	Anderson, B. and Murray, D.	Clinically Relevant Resistance in Cancer Chemotherapy	Kluwer Academic Publishers	Boston	2002	49-66
		W.Kalow, U.A.Meyer R.F. Tyndale (編集) 石川智久 (監訳)	ファーマコゲノミクス：21世紀のゲノム創薬と個別の医療	テクノミック	東京	2002	総ページ434

### 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
Ishikawa, T., Sakurai, A., Kanamori, Y., Nagakura, M., Hirano, H., Takarada, Y., Yamada, K., Fukushima, K., and Kitajima, M.	High-speed screening of human ABC transporter function and genetic polymorphisms: New strategies in pharmacogenomics	Methods in Enzymol		印刷中	2005
Ishikawa, T., Tamura, A., Saito, s., Wakabayashi, K., and Nakagawa, H.	Pharmacogenomics of the human ABC transporter ABCG2: from functional evaluation to drug molecular design	Naturwissenschaften		印刷中	2005

Ishikawa, T., Ikegami, Y., Sano, K., Nakagawa, H., and Sawada, S.	Transport mechanism-based drug molecular design: novel camptothecin analogues to circumvent ABCG2-associated drug resistance of human tumor cells	Current Pharm Design		印刷中	2005
Takahashi, T., Nakai, K., Doi, T., Yasunaga, M., Nakagawa, H., and Ishikawa, T.	Synthesis and Evaluation of 3D Templates Based on a Taxane Skeleton to Circumvent P-glycoprotein-associated Multidrug Resistance of Cancer	Bioorg Medicin Chem Lett		印刷中	2005
Kano M, Tsutsumi S, Kawahara N, Wang Y, Mukasa A, Kirino T, Aburatani H.	A meta-clustering analysis indicates distinct pattern alteration between two series of Gene Expression profiles for induced ischemic tolerance in rats	Physiological Genomics		印刷中	2005
Komura D, Nakamura H, Tsutsumi S, Aburatani H, and Ihara S.	Multidimensional support vector machines for visualization of gene expression data	Bioinformatics	21(4)	439-444	2005
Fukuzawa, K., Kitaura, K., Uebayasi, M., Nakata, K., Kaminuma, T. and Nakano, T.	Ab initio Quantum Mechanical Study of the Binding Energies of Human Estrogen Receptor with its Ligands: An application of Fragment of Molecular Orbital Method	J Comp Chem	26	1-10	2005
Ishikawa, T.	Pharmacogenomics in Drug Transporters: Functional Analysis of Genetic Polymorphisms	Global Outsourcing Review	6 (1)	28-33	2004
Ishikawa, T., Onishi, Y., Hirano, H., Oosuni, K., Nagakura, M., and Tarui, S.	Pharmacogenomics of Drug Transporters: A New Approach to Functional Analysis of the Genetic Polymorphisms of ABCB1 (P-Glycoprotein/MDR1)	Biol Pharm Bull	27	939-948	2004
Ishikawa, T., Hirano, H., Onishi, Y., Sakurai, A., and Tarui, S.	Functional Evaluation of ABCB1 (P-Glycoprotein) Polymorphisms: High-Speed Screening and Structure-Activity Relationship Analyses	Drug Metabol Pharmacokin	19	1-14	2004
Takayanagi, S., Kataoka, T., Ohara, O., Oishi, M., Kuo, M.T., and Ishikawa, T.	Human ATP-binding cassette transporter ABCC10: expression profile and p-53-dependent upregulation	J Exp Ther Oncol	4	239-246	2004
Yoshikawa, M., Ikegami, Y., Hayasaka, S., Ishii, K., Ito, A., Sano, K., Suzuki, T., Togawa, T., Yoshida, H., Soda, H., Oka, M., Kohno, S., Sawada, S., Ishikawa, T., and Tanabe, S.	Novel Camptothecin Analogues that Circumvent ABCG2-associated Drug Resistance in Human Tumor Cells	Int J Cancer	110	921-927	2004
Yoshikawa, M., Ikegami, Y., Sano, K., Yoshida, H., Mitomo, H., Sawada, S., and Ishikawa, T.	Transport of SN-38 by the Wild Type of Human ABC Transporter ABCG2 and Its Inhibition by Quercetin, a Natural Flavonoid	J Exp Ther Oncol	4	25-35	2004
Ishikawa, T., Tsuji, A., Inui, K., Sai, Y., Anzai, N., Wada, M., Endou, H., and Sumino, Y.	The genetic polymorphism of drug transporters: functional analysis approaches	Pharmacogenomics	5	67-99	2004

Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T, Ohki M, Aburatani H, Nagao M, Sugimura T, and Nakagama H.	Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine	Carcinogenesis	25(8)	1495-1505	2004
Nakatani N, Aburatani H, Nishimura K, Semba J, and Yoshikawa T.	Comprehensive expression analysis of a rat depression model	Pharmacogenomics J	4	114-126	2004
Kawahara N, Wang Y, Mukasa A, Furuya K, Shimizu T, Hamakubo T, Aburatani H, Kodama T, and Kirino T.	Genome-wide Gene Expression Analysis for Induced Ischemic Tolerance and Delayed Neuronal Death Following Transient Global Ischemia in Rats	J Cereb Blood Flow Metab	24	212-223	2004
Joo A, Aburatani H, Morii E, Iba H, and Yoshimura A.	STAT3 and MITF cooperatively induce cellular transformation through upregulation of c-fos expression	Oncogene	23	726-734	2004
Zhang, J., Aizawa, M., Amari, S., Iwasawa, Y., Nakano, T., and Nakata, K.	Development of KiBank, a database supporting structure-based drug design	Computational Biology Chemistry	28	401-407	2004
Aizawa, M., Onodera, K., Zhang, J., Amari, S., Iwasawa, Y., Nakano, T. and Nakata, K.	KiBank: A Database for Computer-Aided Drug Design Based on Protein-Chemical Interaction Analysis	Yakugaku zasshi	124	613-619	2004
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	20	731-733	2004
Mitomo, H., Kasamatsu, S., Ito, K., Ikegami, Y., and 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 Pharmacokin	18	194-202	2003
Takayanagi, S., and Ishikawa, T.	Molecular Identification and Characterization of Rat Abcc1 cDNA: Existence of two splicing variants and species difference	J Exp Ther 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
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(4)	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
Watanabe, A., Hippo, Y., Taniguchi, H., Iwanari, H., Yashiro, M., Hirakawa, K., Kodama, T., and Aburatani, H.	An Opposing View on WWOX Protein Function as a Tumor Suppressor	Cancer Res	63	8629-8633	2003
Ge, X., Tsustumi, S., Aburatani, H., and Iwata, S.	Reducing false positives in molecular pattern recognition	Genome Informatics	14	34-43	2003
Mizukami, M., Hasegawa, H., Kohro, T., Toko, H., Kudoh, T., Zou, YZ., Aburatani, H., and Komuro, I.	Gene expression profile revealed different effects of angiotensin II receptor blockade and angiotensin-converting enzyme inhibitor on heart failure	J Cardiovascular Pharmacology	42	S1-S6	2003
Sugiyama, D., Kusahara, H., Taniguchi, H., Ishikawa, S., Nozaki, Y., Aburatani, H., and 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
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 Gene Chip	J Nutr Sci Vitaminol	49	125-132	2003
Kano, M., Nishimura, K., Ishikawa, S., Tsutsumi, S., Hirota, K., Hirose, M., and Aburatani, H.	Expression Imbalance Map: A New Visualization Method for Detection of mRNA Expression Imbalance Regions	Physiol Genomics	13	31-46	2003
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
Toda, K., Ishida, S., Nakata, K., Matsuda, R., Shigemoto-M, Y., Ozawa, S., Sawada, J., Inoue, K., Shudo, K., and Hayashi, Y.	Test of significant differences with a priori probability in micro-array experiments	Analytical Sciences	19	1529-1535	2003
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 and 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 Metabol Pharmacokin	18	71-78	2003
Kaminuma, T. and Nakata, K.	Global information network on chemicals (GINC) and its Asian component	Toxicology	190	93-103	2003
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
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 (Arg 482)	Drug Metabol Pharmacokin	17	130-135	2002
Higuchi A, Shimmura S, Ishii M, Aburatani H, and Tsubota K.	Serum- and serum deprivation-induced transcriptional profiles of cultured conjunctival epithelial cells	Adv Exp Med Biol	506 (Pt A)	673-676	2002
Nakajima A, Wada K, Katayama K, Saubermann, L., Osawa E, Nagase H, Ueno N, Matsuhashi N, and Aburatani H.	Gene expression profile after peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligand administration in dextran sodium sulfate mice	J Gastroenterol	37 Suppl 14	62-66	2002
Saubermann, LJ Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadowaki T, Aburatani H, Matsuhashi N, Nagai R, and Blumberg RS.	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis	Inflammatory Bowel Diseases	8 (5)	330-339	2002
Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H, and Miyazono K.	Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells	J Cell Physiol	193 (3)	299-318	2002
Saiura A, Kohro T, Yamamoto T, Izumi A, Wada Y, Aburatani H, Sugawara Y, Hamakubo T, Taniguchi T, Naito M, Kodama T, and Makuuchi M.	Detection of an up-regulation of a group of chemokine genes in murine cardiac allograft in the absence of interferon-gamma by means of DNA microarray	Transplantation	73(9)	1480-1486	2002
Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, Kodama T, and Aburatani H.	Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays	Cancer Res	62	233-240	2002
Nakata, K., Takai-Igarashi, T., Nakano, T. and Kaminuma, T.	An Integrated Receptor Database (IRDB)	Data Sci J	1	271-276	2002
Nakata, K.	Theoretical Approach to Endocrine Disruptors	Frontiers in Bioscience	7	68-73	2002



### III. 研究成果の刊行物・別冊

## 13

# ファーマコゲノミクス： 薬物トランスポーターの 遺伝子多型と薬剤応答性

石川智久

## 要 旨

ゲノム創薬と個の医療において、薬理効果を向上させて副作用を抑制することは重要課題である。近年になって薬剤応答性における薬物トランスポーターの重要性が注目されている。ヒトゲノム解析によって、これまでにヒト薬物トランスポーターの遺伝子が多数発見され、薬物の消化管吸収、組織への分布、肝臓腎臓からの排泄など、薬物とその代謝物の輸送と密接に結びついていることが明らかになった。また、ヒトゲノム塩基多型 (SNP) の網羅的解析により、薬物トランスポーターの遺伝子多型の情報が蓄積している。薬物を輸送するヒト ABC トランスポーターの基質特異性と SNP との相関関係や、プロモーター領域にある SNP の遺伝子発現への影響を *in vitro* 実験で検証する必要がある。また、その研究結果を速やかにデータベースとして統合して、薬剤応答性予測に役立つ測定技術を開発することが重要である。

## キーワード

● ABC トランスポーター ● 遺伝的多型 ● 薬剤応答性  
● 基質特異性 ● プロモーター領域

## 3-1・はじめに

ヒトゲノムの配列は、すべての人々が同じというわけではなく、数百から約 1000 塩基対の割合で一つの塩基の違いがある。そのなかでもとくに人口中 1 % 以上の頻度で存在するものを一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) という。一塩基多型には、単遺伝子疾患をひき起こしたり、多遺伝子疾患の発症を早めたりする変異から、個人の表現型に影響を及ぼさない中性的な変異までさまざまなものがある。さらに代謝経路において個人間に差異をひき起こす遺伝子変異もゲノムには存在する<sup>1)</sup>。シトクロム P450 酵素や N-アセチル基転移酵素 (N-acetyltransferase) のような薬物代謝酵素をコードしている遺伝子は、このタイプの遺伝子多型の例としてよく研究されてきた<sup>2)</sup>。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などを推進すること、すなわ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<sup>3)</sup>。2003 年 11 月 3 日、米政府食品医薬品局 (FDA) は新薬の臨床開発申請の際に必要な遺伝子多型などのファーマコゲノミクス情報に関するドラフトガイダンスを発表した。それによって、ゲノム創薬の現場において、ファーマコゲノミクスの研究データが臨床開発に求められる時代がとうとう到来したのである。

薬物トランスポーターにも一塩基多型の存在が近年報告され、その機能解析が世界的に注目をあびるようになってきた。薬物トランスポーターは薬物代謝酵素に匹敵して、薬物の体内動態を規定する重要な因子である。また、癌においては抗癌剤に対する耐性の分子メカニズムの一つでもある。吸収・分布・排泄に関与するトランスポーターなどの 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、反応群/不応群（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など、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<sup>4)</sup>。

## 13-2・薬物トランスポーターと薬剤応答性

薬剤応答性の違いは、薬物代謝酵素や薬物のターゲット分子の発現量の差および遺伝的多型によるものと考えられてきたが、薬物トランスポーターの重要性が近年クローズアップされている<sup>2)</sup>。薬物トランスポーターは、薬物代謝酵素と並んで、薬物の体内動態に大きく寄与し、薬剤応答性に密接に関係している事実が蓄積しつつある。受動的な拡散は、多くの脂溶性化合物の膜輸送にとって基本的な機構であるが、これだけでは細胞の薬物輸送を完全に説明できない。個々の患者における薬剤応答の差の根幹である未知の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および分子生物学的研究である<sup>2)</sup>。その研究のターゲットには、ABCB1（P-糖タンパク質/MDR1）やABCC1（MRP）、ABCG2（BCRP）といったABC（ATP-binding cassette；ATP結合領域）トランスポーターをはじめ、溶質トランスポーターであるオリゴペプチドトランスポーター（PEPT）、モノカルボン酸トランスポーター（MCT）、有機アニオントランスポーター（OAT, OATP, NPT, NTCP）、有機カチオントランスポーター（OCT, OCTN）などがある<sup>2)~5)</sup>。これら溶質トランスポーターは、小腸や腎臓の上皮細胞、肝細胞、脳血管内皮細胞にも発現して、薬剤輸送にも関与している。薬物トランスポーターの分子機構の解明とその薬物動態上の意義を定量的に解析することは、ポストゲノム時代における合理

### キーワード解説

- ABCトランスポーター：ABCとはATP-binding cassetteの略であり、生物種を超えてアミノ酸配列（Walker AとWalker Bのモチーフ）がよく保存されたATP結合領域をもつ。ABCトランスポーターはATPの加水分解エネルギーを利用して、薬物や内因性物質を膜輸送するタンパク質であり、ヒトでは48種類のABCトランスポーター遺伝子が確認されている。
- 遺伝子多型：ヒト遺伝子の大部分の塩基配列は同一である。しかしながら、遺伝子の塩基配列の大部分が同一でも、実際には個人間で差が存在する。それを遺伝子多型という。その差が疾患感受性や薬物応答性に関係すると考えられている。
- プロモーター領域：DNAを鋳型にmRNA合成（転写）を開始するDNA上の特定の塩基配列を指す。塩基の共通配列をもち、これを認識してRNAポリメラーゼⅡがmRNAを合成する。プロモーターは転写の効率を決定して、遺伝子発現レベルに影響を与える。

的な創薬分子デザイン戦略、ターゲット部位への特異的な薬剤デリバリーの開発、臨床診断に大きく貢献すると考えられる。

### 13-3・薬物トランスポーターの遺伝子多型の機能解析

薬物動態に大きく関与する薬物トランスポーターに関しても SNP が発見されており、薬物の吸収、分布、排泄への効果が示唆されている<sup>9)</sup>。これまで、薬物代謝酵素や薬物のターゲット分子（酵素、イオンチャネル、ホルモン、受容体）における遺伝的多様性が解明されてきたものの、薬物トランスポーターの遺伝子多型とそれによる機能および遺伝子発現の変化については、まだ十分解明されていない。SNP の薬物トランスポーターへの影響を解析するにあたっては、少なくとも次の二つの場合を考慮しなくてはならないだろう。

- 1) アミノ酸変異を伴う SNP によって、薬物トランスポーターの機能が変化する場合。
- 2) プロモーター領域の SNP によって薬物トランスポーター遺伝子の発現レベルが変化する場合。

前者は質的变化であり、後者は量的変化である。とくに後者について、薬物トランスポーター遺伝子の発現の変化は、薬を長期投与する際、薬理効果の低下や副作用の原因にもなる可能性がある。

筆者らは、これらのことを考慮して、薬物トランスポーターの SNP 機能解析（タンパク質の機能および遺伝子発現）を包括的に解明し、薬剤応答性の分子メカニズムを探究している。筆者らがめざす研究目標は次のとおりである。

- 1) エキソン領域の SNP が薬物トランスポーターに及ぼす影響を、変異タンパク質を発現させて基質特異性スクリーニングによって解明する。
- 2) 薬物トランスポーター遺伝子のプロモーター領域のバイオインフォマティクスの解析を行い、SNP データベースに基づいてプロモーター領域の変異を同定する。
- 3) プロモーター領域の SNP が遺伝子発現に与える影響を解析するための *in vitro* 実験系を確立する。

#### ヒト ABC トランスポーターのアミノ酸変異と基質特異性

遺伝子クローニングやヒトゲノム解析情報に基づいて、現在のところ約 50 個のヒト ABC トランスポーター遺伝子が発見されている<sup>6)~8)</sup>。ABC トランスポーターは比較的一次構造がよく保存されたモチーフ（Walker A と Walker B）、ATP 結合領域（ABC）、特徴的な膜貫通領域をもち、その構造の相同性に基づいて A~G の七つのサブファミリーに区分されている。トランスポーターの多くが内因性物質や異物とその代謝物の輸送に関与することが明らかになってきた。ここでは紙面の都合上、ABCB1 と ABCG2 についてのみ、アミノ酸変異による基質特異性の変化の例を紹介する。

##### i) ABCB1 (P-gp/MDR1) における遺伝子多型の機能解析

ヒト ABC トランスポーターの中で最初に発見されて、これまで最も詳しく研究されているものは ABCB1 (P-糖タンパク質, P-gp/MDR1) である。この ABC トランスポーターは、ATP に依存した制癌剤の細胞外への能動的輸送が癌細胞の多剤耐性分子機構として認識された最初の例でもある。ABCB1 は広範囲な基質特異性をもち、アドリアマイシン、タキ

図 13-1 アミノ酸変異をもつ ABCB1 の遺伝子多型

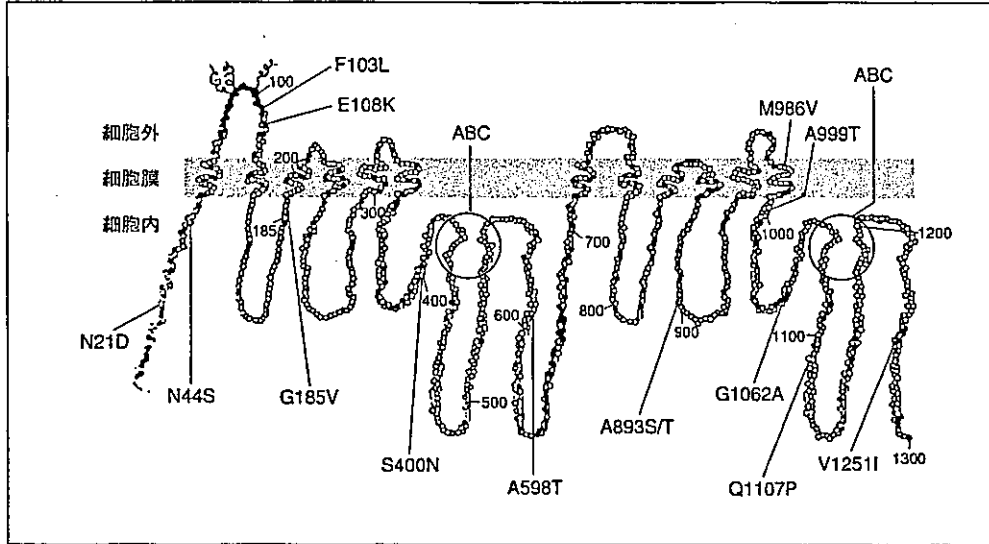


図 13-2 アミノ酸変異をもつ ABCB1 の Sf9 細胞での発現

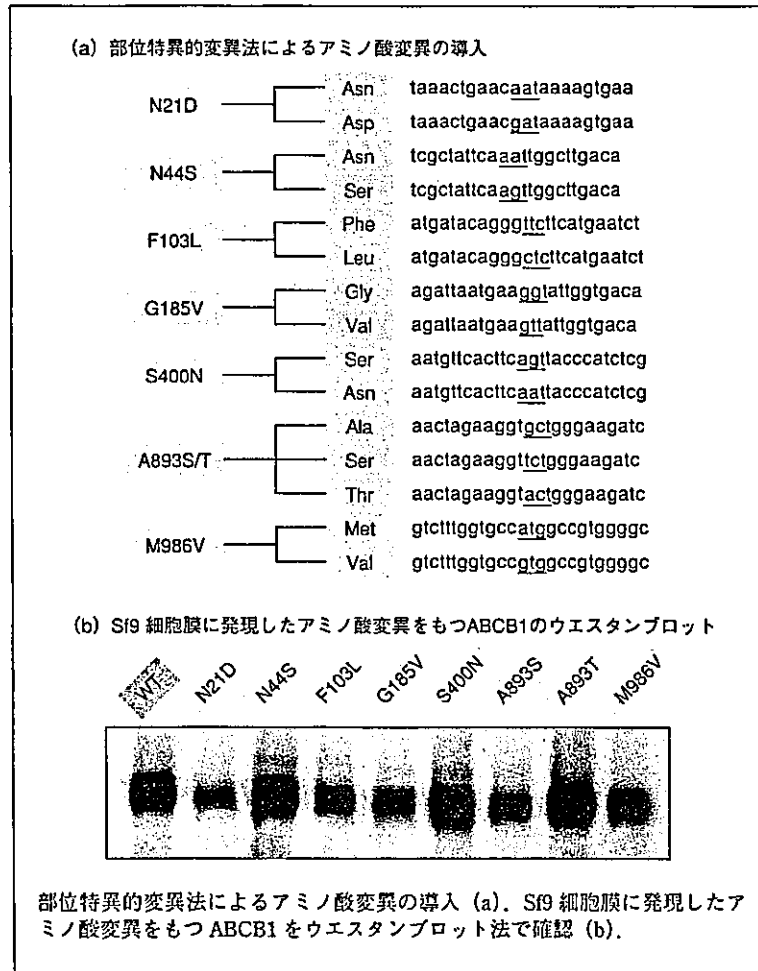


表 13-1 アミノ酸変異をもつ ABCB1 バリエントのベラパミルに対する  $K_m$  値と  $V_{max}$  (文献 5)

バリエント	$K_m$ [ $\mu M$ ]	$V_{max}$ [nmol/min/mg タンパク質]
Wild type	2190 $\pm$ 0.150	13.14 $\pm$ 1.95
N21D	0.502 $\pm$ 0.126	45.26 $\pm$ 11.33
N44S	0.580 $\pm$ 0.148	31.03 $\pm$ 4.65
F103L	1.100 $\pm$ 0.078	36.34 $\pm$ 8.33
G185V	0.831 $\pm$ 0.102	56.76 $\pm$ 6.76
S400N	0.327 $\pm$ 0.025	13.74 $\pm$ 2.08
A893S	0.441 $\pm$ 0.042	17.24 $\pm$ 6.72
A893T	0.904 $\pm$ 0.244	10.77 $\pm$ 1.35
M986V	0.419 $\pm$ 0.062	22.69 $\pm$ 6.84

ソール、ピンプラスチン、ピンクリスチン、コルシチンなど多様な分子構造をもつ疎水性化合物を細胞外へ輸送排出する。その働きにより、これら抗癌剤の細胞内における蓄積が低下し癌細胞は耐性を獲得する。一方、ABCB1 は正常細胞にも発現している、小腸の刷子縁膜や、肝臓の胆管側細胞膜、腎臓の近位細尿管の内腔膜、脳の血管内皮細胞（血液脳関門）、網状脈絡層に局在する。その局在パターンから、ABCB1 は生体にとって有害な物質の侵入を阻止したり、速やかに体外に排出する生体防御機構の一つである一方、薬物の小腸での吸収や中枢神経系への移行において重要な役割を果たす。

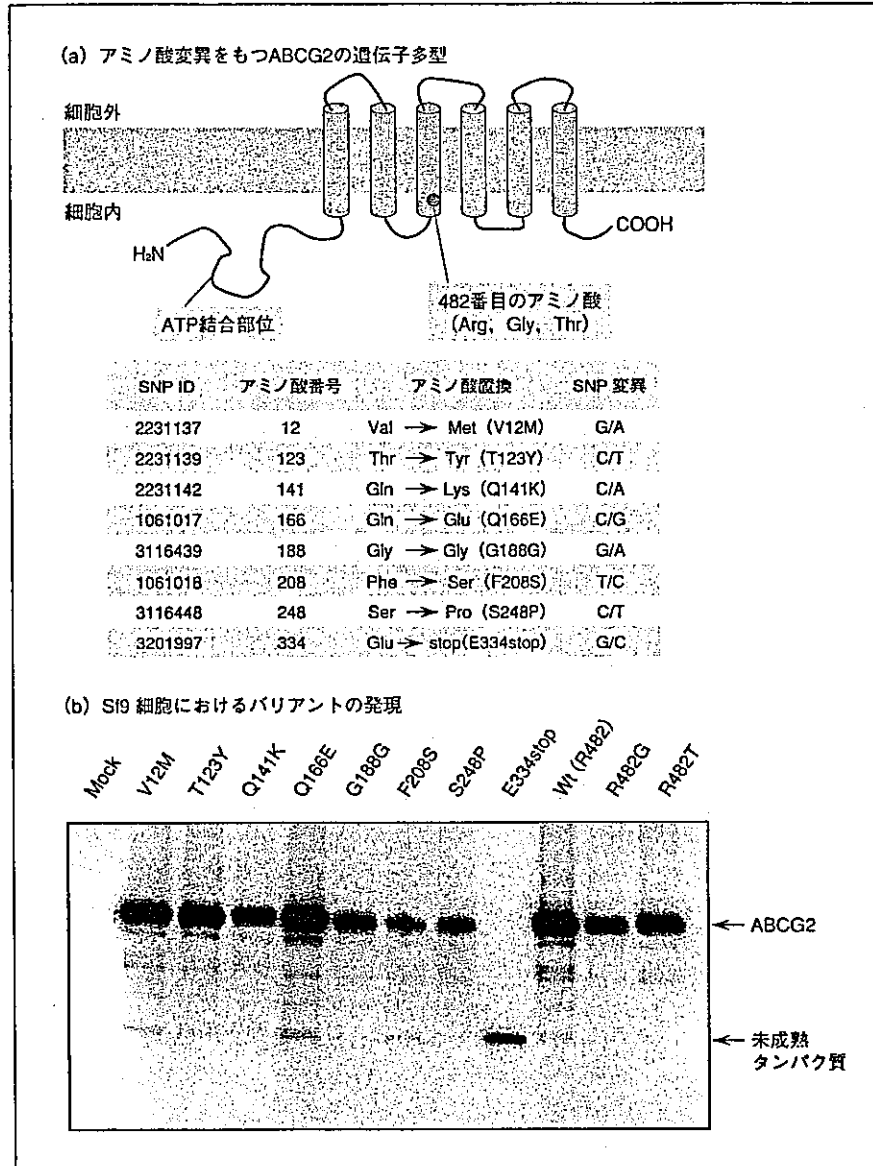
多様な薬物に対する ABCB1 の基質特異性を解析するために、筆者らは 96 ウェルプレートを用いたスクリーニング方法を確立した<sup>9)</sup>。また、Sf9 昆虫細胞系を用いることによって、効率良くヒト ABCB1 を発現させることにも成功した。Sf9 細胞膜には内因的な ATPase 活性が存在するが、ABCB1 を発現する Sf9 細胞膜では、基質を加えると ATPase 活性に有意な上昇が確認された。基質特異性の解析には、41 種類の市販医薬品および生理活性物質を用いて ATPase 活性を測定し、Chemical Fragmentation Codes による定量的解析を行った（詳細は文献 9 を参照）。

次に、アミノ酸変異をもつバリエント (Asn21Asp, Asn44Ser, Phe103Leu, Gly185Val, Ser400Asn, Ala893Ser, Ala893Thr, Met986Val) を部位特異的変異法により作成し、Sf9 昆虫細胞に発現させた (図 13-1, 図 13-2a)。そして、その発現細胞から細胞膜画分を調製して、機能解析 (ATPase 活性測定) を行った。アミノ酸変異をもつ ABCB1 バリエントの基質特異性 ( $K_m$  値および  $V_{max}$ ) を解析する場合、ABCB1 の Sf9 細胞における発現量をきちんと定量化する必要がある。ABCB1 を発現した Sf9 細胞膜をさまざまなタンパク質量で SDS-PAGE で電気泳動を行って、ウエスタンブロット法で解析を行った結果 (図 13-2b)、電気泳動を行った Sf9 細胞膜タンパク質量の対数値と免疫反応シグナル (化学発光) 強度との間に、線形の比例関係が認められた (詳細は文献 5 を参照)。その線形関係に基づいて、Sf9 細胞膜に発現したアミノ酸変異をもつ ABCB1 のベラパミルに対する  $V_{max}$  および  $K_m$  値を求めた結果、各バリエント間で、 $V_{max}$  および  $K_m$  値に有意な差が認められた (表 13-1)。この差が薬物の体内動態にどのように寄与するのかを解明するためには、今後臨床データとの関連づけが必要である<sup>10)</sup>。

#### ii) ABCG2 (BCRP) における遺伝子多型の機能解析

ABCG2 (BCRP) はアントラサイクリン耐性の乳癌細胞株、ミトキサントロン耐性のヒ

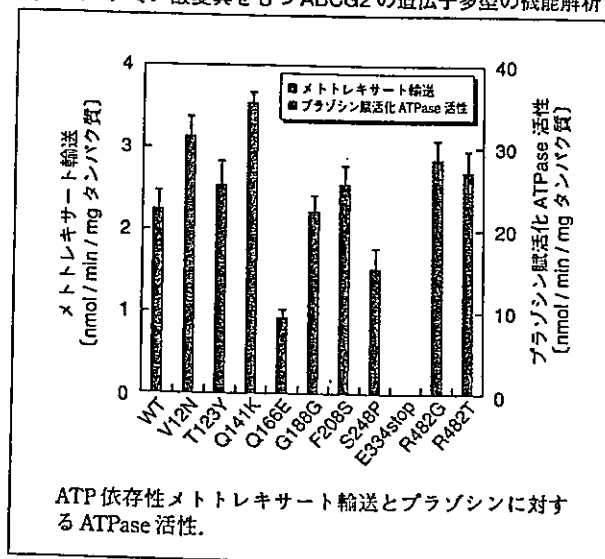
図 13-3 ABCG2 の遺伝子多型とバリエーションの発現



ト大腸癌細胞株，そしてヒト胎盤 cDNA ライブラリーからクローニングされた新規 ABC トランスポーターである。筆者らは，次のアミノ酸変異を伴う遺伝子多型および獲得変異の機能への影響を解明した。これらは Val12Met, Thr123Tyr, Gln141Lys, Gln166Glu, Phe208Ser, Ser248Pro, Glu334stop, Arg482Gly, Arg482Thr である (図 13-3a)。これらアミノ酸変異をもつバリエーション cDNA を Sf9 昆虫細胞に発現させて (図 13-3b)，機能解析を行った。Val12Met, Thr123Tyr, Gln141Lys, Gln166Glu, Phe208Ser, Ser248Pro のバリエーションを発現した Sf9 細胞膜小胞 (ベシクル) は ATP に依存した  $[^3\text{H}]$ メトトレキサート輸送活性を示した (図 13-4)。一方，Glu334stop, Arg482Gly, Arg482Thr のバリエーションは，メトトレキサートを全く輸送しなかった。さらに Arg482Gly, Arg482Thr のバ

リアントでは、他のバリエーションと異なり、プラゾシンに対する ATPase 活性が確認された (図 13-4)。このように、アミノ酸変異によって基質特異性が大きく変化する場合がある。

図 13-4 アミノ酸変異をもつ ABCG2 の遺伝子多型の機能解析



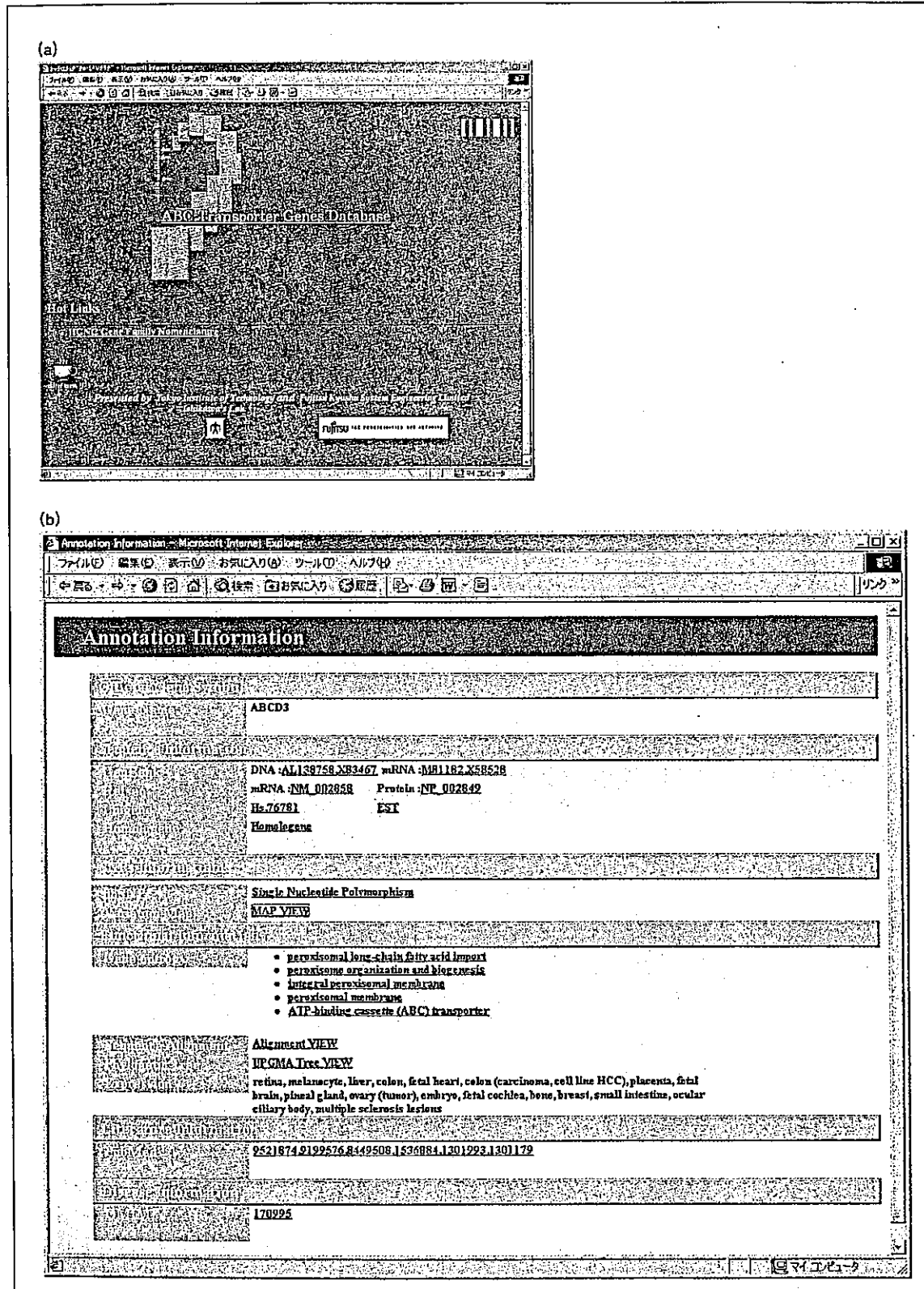
昆虫細胞で得られた結果を哺乳類細胞で検証するために、pcDNA3.1 ベクターを用いて ABCG2 の野生型 (Arg482) と獲得変異体 (Arg482Gly, Arg482Thr) を HEK293 細胞に恒常的に発現させた<sup>12)</sup>。昆虫細胞膜の系で観測されたのと同様に、ABCG2 の野生型 (Arg482) は ATP 依存性メトトレキサート輸送能力をもつ一方、Arg482Gly と Arg482Thr タイプはメトトレキサートを輸送しなかった。さらに ABCG2 野生型 (Arg482) はイリノテカンの活性中間体である SN-38 に対する耐性に寄与することが判明した<sup>13)</sup>。また、獲得変異体はミトキサントロン、ドキシソルピシン、ダウノルピシンに対する耐性に大きく寄与していることが判明した<sup>13)</sup>。これらの結果から今後、機能に関する SNP を同定し解析することは、臨床での薬剤応答性と SNP との関係を解明するうえできわめて重要になると考えられる。

### 13-4・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。ABC トランスポーターの機能、基質特異性、薬物輸送機構は現在国内外で幅広く研究され多くの知見が得られているが、ABC トランスポーターの時期・組織特異的発現メカニズムに関してはほとんど研究が進んでおらず、不明な点が多い。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かか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。



図 13-5 ヒト ABC トランスポーター遺伝子のデータベース  
 (http://www.humanABC.bio.titech.ac.jp, www.humanABC.bio.titech.ac.jp/ABCdemo/ABCA3.html)



このような現状を鑑みて、筆者らはヒト ABC トランスポーター遺伝子の染色体位置、遺伝子多型、遺伝子プロモーター、基質特異性などの情報を統合するデータベースを作成した<sup>14)</sup>。ヒト ABC トランスポーター遺伝子の国際命名法<sup>6),7)</sup>に従って、それぞれの遺伝子を染色体上にマップし、NCBI SNP db や GenBank とリンクを張った。また、ヒト ABC トランスポーター遺伝子のサブグループ分類に従って、遺伝子および cDNA の配列、SNP 情報、遺伝子疾患との関連、生理的機能、典型的基質を統合するデータベースを作成し、関連する情報源へのアクセスを実現した。一方、現在知られているヒト ABC トランスポーター遺伝子上流域 (2~5 kb) の解析を行い、組織特異的な発現制御に関係する転写因子とその結合部位を予測して、その解析結果を含むデータベース (<http://www.humanABC.bio.titech.ac.jp>) を公開した (図13-5)。

このデータベース<sup>14)</sup>では、染色体の ABC トランスポーター遺伝子をクリックすることにより該当する遺伝子の情報を得ることができる。遺伝子の GenBank アクセス番号、mRNA 配列、タンパク質のアミノ酸配列、EST データ、ホモログ、SNP マップ、配列アライメント、分子系統樹などの情報を獲得でき、PubMed や OMIM へのアクセスが可能である。今後、各遺伝子上流域の発現制御に関係する転写因子とその結合部位も掲載し、薬物の ABC トランスポーターの発現制御への寄与を予測できるデータベースに発展させる計画である。

## 13-5・将来展望

将来、薬物トランスポーターの遺伝子多型を考慮に入れた創薬アプローチは、薬剤の臓器特異的なターゲティングに関係し、“適切な薬を適切な患者に適切な投与量で”という医療の究極のゴールと一致すると考えられる。日本の社会では総人口のうち高齢者の占める割合が増え続け、癌、アルツハイマー病、老人性痴呆などの神経疾患のほか、リウマチ、痛風、膠原病といった加齢者の QOL (生活の質) の低下を招く疾患に対して、より効果的な治療をしなければならない。しかしながら、薬剤に対する応答性の個人差や慢性疾患に対する長期にわたる薬物治療における応答性の経時的変化は重要な課題である。この意味において、個人間での薬剤応答性の差違をひき起こす一つの原因として薬物トランスポーターの寄与は大きいと考えられ、それを迅速に臨床診断する方法と新しい治療方法の開発が早急に必要である<sup>3)</sup>。

### 文 献

- 1) Kalow W, Meyer UA, Tyndale RF (石川智久 監訳), “ファーマコゲノミクス: 21 世紀のゲノム創薬と個の医療”, テクノミック, 2002.
- 2) 石川智久・堀江透 編, “創薬サイエンスのすすめ: ポストゲノム時代へのパラダイムシフト”, 共立出版, 2002.
- 3) 石川智久, “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”, エルゼビア・ジャパン, 2003.
- 4) 石川智久, 笠松志保, 吉川恵美, 池上洋二: 医薬品開発研究におけるファーマコゲノミクスの利用. 薬物動態, 16: 353-363, 2001.
- 5) Ishikawa T, Tsuji A, Inui K, Sai Y, Anzai N, Wada M, Endou H, Sumino Y: The genetic polymorphism of drug transporters: Functional analysis approaches. Pharmacogenomics, 5: 67-99, 2004.
- 6) <http://gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/abc.html>

- 7) Ishikawa T, Allikmets R, Dean M, Higgins C, Ling V, Wain HM: New Nomenclature of human ABC transporter genes. *Xenobio. Metabol. Dispos.*, 15: 8-19, 2000.
- 8) Ishikawa T: 'Multidrug resistance: genetics of ABC transporters', in "Nature Encyclopedia of the Human Genome", Cooper DN ed., vol. 4, p.154-160, Nature Publishing Group, London, 2003.
- 9) Onishi Y, Hirano H, Nakata K, Oosumi K, Nagakura M, Tarui S, 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.
- 10) Ishikawa T, Hirano H, Onishi Y, Sakurai A, Tarui S: Functional evaluation of ABCB1 (P-glycoprotein) polymorphisms: High-speed screening and structure-activity relationship analysis. *Drug Metab. Pharmacokin.*, 19: 1-14, 2004.
- 11) Ishikawa T, Kasamatsu S, Hagiwara Y, Mitomo H, Kato R, Sumino Y: Functional characterization of polymorphisms of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 expressed in Sf9 insect cells. *Drug Metab. Pharmacokin.*, 18: 194-202, 2003.
- 12) Mitomo H, Kato R, Ito A, Kasamatsu S, Ikegami Y, Sumino Y, Ishikawa T: A functional study on the polymorphism of ATP-binding cassette transporter ABCG2: Critical role of Arg482 in Methotrexate transport. *Biochem. J.*, 373: 767-774, 2003.
- 13) Yoshikawa M, Ikegami Y, Sano K, Yoshida H, Mitomo H, Sawada S, Ishikawa T: Transport of SN-38 by the wild type of human ABC transporter ABCG2 and its inhibition by quercetin, a natural flavonoid. *J. Exp. Ther. Oncol.*, 4: 25-35, 2004.
- 14) Kitajima M, Matsubara K, Ishikawa T: <http://www.humanABC.bio.titech.ac.jp>

# Multidrug Resistance in Cancer: Genetics of ABC Transporters

Toshihisa Ishikawa, *Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan*

Multidrug resistance in human cancer is the major obstacle to long-term, sustained response of a patient to chemotherapy. It has been convincingly documented that several adenosine triphosphate-binding cassette transporters cause multidrug resistance in cancer cells by actively extruding the clinically administered chemotherapeutic drugs.

## Intermediate

### Article contents

- Individual Differences in Drug Response
- Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy
- ATP-binding Cassette Transporter Genes and Proteins
- New Aspects

## Individual Differences in Drug Response

In the last decade of the twentieth century, the development of high-throughput screening and combinatorial chemistry technologies accelerated the process of drug discovery. In the twenty-first century, emerging genomic technologies (i.e. bioinformatics, functional genomics and pharmacogenomics) are shifting the paradigm of drug discovery research and improving the strategy of medical care for patients. Identification of human deoxyribonucleic acid (DNA) sequences, genomic structures and human genetic variations, along with changes in gene and protein expression, allows researchers and clinicians to more precisely define diseases and, in turn, to achieve the goal of 'personalized medicine'.

In order to realize this personalized medicine, it is critically important to understand the molecular mechanisms underlying the differences between the drug responses of individuals, namely pharmacological effects versus side-effects. The occurrence of variations in the drug response of individuals may involve many different causes, for example genetic variations and/or expression levels of drug target molecules including membrane receptors, nuclear receptors, signal transduction components, enzymes, etc. as well as those of drug metabolizing enzymes and drug transporters. Observations of interindividual variations in responses to different drugs have led to the development of the fields of pharmacogenetics and pharmacogenomics.

## Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy

Cancer is a gene-associated disease involving multiple causal and developmental factors. Despite enormous

efforts made in the development of cancer chemotherapies, these therapies are often effective only in a relatively small proportion of cancer patients. Acquired and intrinsic drug resistance in cancer is the major obstacle to long-term, sustained response of patients to chemotherapy. It has long been recognized that the effectiveness of anticancer drugs can vary significantly among individual patients. It is obvious that the susceptibility of cancer cells to particular anticancer drugs cannot be predicted by a single factor but is determined by many factors that influence overall sensitivity. Cancer cells appear to have the capacity to generate variants resistant to anticancer drugs as part of their biological response to external challenges. Tumors, and even individual cancer cells, can exhibit multiple mechanisms of resistance simultaneously. In order to overcome resistance it may be necessary to achieve a high rate of tumor cell kill before multiple resistance mechanisms can develop, and/or to develop therapeutics that simultaneously target several resistance mechanisms. Two major factors need to be considered when regarding the efficacy of particular anticancer drugs:

- local concentrations of drug in blood or tissue can be influenced by the activities of drug-metabolizing enzymes, which may activate or inactivate the drug, and the actions of drug transporters;
- differences in individual drug efficacies may also reflect the intrinsic susceptibility of cancer cells to those anticancer drugs.

There is accumulating evidence that active export of anticancer drugs from cells is one of the major mechanisms of drug resistance. It has been convincingly documented that several adenosine triphosphate (ATP)-dependent drug transporters can cause drug resistance in cancer cells by actively extruding the