

表 8.4 ヒト ABC トランスポーターのサブファミリーメンバー

シンボル	名前	蛋白質	染色体	遺伝子変異による疾病
<b>A. サブファミリー</b>				
ABCA1	ABC1	2201	9q31	Tangier 疾患 1 型
ABCA2	ABC2, KIAA1062	2174	9q34	
ABCA3	ABC3, ABC-C	1704	16p13.3	
ABCA4	ABCR	2273	1p22	STGD1, ARMD2, RP19, COD, CRD
ABCA5	(EST90625)		17q21-q25	
ABCA6	(EST155051)		17q21	
ABCA7	ABCX	1840	19p13.3	
ABCA8	KIAA0822	1581	17q24	
ABCA9	(EST640918)			
ABCA10	(EST698739)			
ABCA11	(EST1133530)			
<b>B. サブファミリー</b>				
ABCB1	P 糖蛋白質, MDR1	1280	7q21	
ABCB2	TAP1	686	6p21.3	
ABCB3	TAP2	748	6p21.3	
ABCB4	Pgp3, MDR3	1279	7q21	進行性家族性肝内胆汁うっ滞 3 型
ABCB5	ABC19, (EST422562)		7p14	
ABCB6	ABC14, (EST45597)		2q33-q36	
ABCB7	ABC7 (EST140535)	752	Xq13.1-q13.3	X 染色体連鎖鉄芽球性貧血性運動失調
ABCB8	M-ABC1	718	7q35-q36	
ABCB9	(EST122234)		12q24	
ABCB10	(EST20237)		1q32	
ABCB11	BSEP, sPGP	1321	2q24	進行性家族性肝内胆汁うっ滞 2 型
<b>C. サブファミリー</b>				
ABCC1	MRP1, GS-X	1531	16q13.12-p13	
ABCC2	MRP2, cMOAT, cMRP	1545	10q23-p24	Dubin-Johnson 症候群
ABCC3	MRP3, MOAT-D, MLP2	1527	17q21	
ABCC4	MRP4, MOAT-B	1325	13q31	
ABCC5	MRP5, MOAT-C, SMRP	1437	3q25-p27	
ABCC6	MRP6, MLP1	1503	16p13.1	弾性線維仮性黄色腫
ABCC7	CFTR	1480	7q31	嚢胞性線維症
ABCC8	SUR1	1581	11p15.1	PHH1
ABCC9	SUR2	1549	12p12.1	
ABCC10	MRP7(?) (AK00002.1)		6p21	
ABCC11		1383	16q12.1	
ABCC12		1359?	16q12.1	
<b>D. サブファミリー</b>				
ABCD1	ALD, ALDP, AMN	745	Xq28	副腎白質萎縮症
ALD1P1			2p11	
ALD1P2			10p11	
ALD1P3			16p11	
ALD1P4			22p11	
ABCD2	ALDL1, ALDR, ALDRP	740	12q11	
ABCD3	PMP70, PXMP1	659	1p21-p22	Zellweger 脳肝腎症候群
ABCD4	PMP69, PXMPIL, P70R	606	14p24.3	
<b>E. サブファミリー</b>				
ABCE1	RNASEL1, OABP	402	4q31	

F. サブファミリー				
ABCF1	ABC50	807	6p21.33	
ABCF2	(EST133090)		7q35-q36	
ABCF3	(EST201864)		3q25.1-q25.2	
G. サブファミリー				
ABCG1	WHITE, ABC8	638	21q22.3	
ABCG2	MXR, BCRP, ABCP	655	4q22-q23	
ABCG3	MXR2		8p12	
ABCG4				
ABCG5		651	2p21	シトステロール血症
ABCG8		673	2p21	シトステロール血症

STGD1: Stargardt 黄斑変性症, ARMD2: 年齢関連性の黄斑変性症, RP19: 網膜色素変性症19, COD: 錐体変性症, CRD: 錐体桿体網膜変性症, PHHI: 新生児持続性高インスリン性低血糖症.

関与することも明らかになっている。ヒトゲノム解析プロジェクトやその他の遺伝子大規模シーケンスプログラムの急速な進展によって、最近3年間に多くのヒトABC蛋白質遺伝子が発見され、現時点で48以上のABC蛋白質が同定されている。また、インターネットを通じて完全および部分的シーケンス (expressed sequence tag: EST) の情報を獲得するのが容易になったことも、この分野の研究の発展にとって強い推進力となった。

シーケンスの類似性、膜貫通領域 (TM)、ATP 結合領域 (ABC) の構成パターンに基づいてAからGの7つのサブファミリーに区分されている。ヒト遺伝子の解析が進んで新規のABC蛋白質が発見されるたびに、新しいサブファミリーとそのメンバーが随時追加される予定である\*。表8.4には、現時点でわかっているそれぞれのサブファミリーメンバーをまとめた。各ABCトランスポーターの基質や生理機能が明らかにされるにつれて、チャネルや受容体機能をもつものも存在することがわかり、1次構造からはその多様な機能分化を予測することはできない。表8.4に示されたすべてのABCトランスポーターの機能が解明されたわけではなく、オーファンABCトランスポーターというべき機能不明のものも多く存在する。表8.5はこれまでの文献情報に基づいたABCトランスポーターの基質を示す。

ヒト正常組織にはP糖蛋白質やMRPファミリーに属するトランスポーター以外にもさまざまなABCトランスポーターが存在し、生体内・外物質を細胞外へ排出していることが明らかになってきた。最近発見されたBCRP (ABCG2) もヒト正常組織において、胎盤の合胞体栄養細胞、腸管上皮細胞、肝胆管側膜、静脈内皮細胞など多くの組織で発現が観察されており、肝臓での解毒、消化管での異物排泄、胎児に対する防御機能に関与すると考えられる。このことにより、これら組織における疾患との関わりも興味もたれる。また、ヒトABCGサブファミリーにはBCRP (ABCG2) のほかにABCG1, ABCG3, ABCG4, ABCG5, ABCG8が報告されている。ABCG5およびABCG8は分子進化

\* ABCトランスポーターの国際命名委員会: ヒトABC蛋白質遺伝子の発見数増加に伴って、それらABC蛋白質の統一的な命名法とクラス分けの必要性が高くなってきた。1999年2月オーストリアで開催された2nd FEBS Advanced Lecture Course "ATP-Binding Cassette Transporters: From Multidrug Resistance to Genetic Disease" において、ABC蛋白質についても一定の基準に基づいた命名法を導入することがDr. Hester Mary Wainらによって提案された。彼らの呼びかけに答えてヒトABC蛋白質遺伝子の命名委員会が組織され、現在Dr. Victor Ling (British Columbia Cancer Research Center, Canada), Dr. Michael Dean (National Cancer Institute Frederick, USA), Dr. Rando Allikmets (Columbia University, USA), Dr. Christopher Higgins (Imperial College London, U.K.), 石川智久 (東京工業大学) が参画している。ヒトABC蛋白質遺伝子の命名委員会ホームページ <http://gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/abc.html>

表 8.5 ABC トランスポーターの基質

シンボル	別名	基質
ABCA1		脂質, コレステロール
ABCA2		estramustine
ABCB1	P 糖蛋白質	疎水性有機カチオン, ステロイド
ABCB2		ペプチド
ABCB3		ペプチド
ABCB4	MDR2	ホスファチジルコリン
ABCB7		鉄 (ミトコンドリア)
ABCB11	SPGP/BSEP	1 価アニオン性胆汁酸
ABCC1	MRP1	アニオン性抱合体 (グルタチオン, グルクロン酸, 硫酸), 酸化型グルタチオン, ロイコトリエン C <sub>4</sub> , 有機アニオン, 制がん薬 + GSH
ABCC2	MRP2/cMOAT	アニオン性抱合体 (グルタチオン, グルクロン酸, 硫酸), 酸化型グルタチオン, ロイコトリエン C <sub>4</sub> , 有機アニオン
ABCC3	MRP3	グルクロン酸抱合体, 有機アニオン
ABCC4	MRP4	ヌクレオシド型抗ウイルス薬
ABCC5	MRP5	cGMP, 有機アニオン
ABCC7	CFTR	Cl <sup>-</sup> , 有機アニオン?
ABCD1		長鎖脂肪酸? (ペルオキシソーム)
ABCG1		トリプトファン? グアニン?
ABCG2	BCRP	ミトザントロン, ドキソルビシン, ダウノルビシン, SN38, SN38 グルクロン酸抱合体, ローダミン 123
ABCG5		植物性ステロール
ABCG8		植物性ステロール

上最も近接し、ともに肝臓および小腸に強い発現が見られる。これら遺伝子はシトステロール血症患者から疾患遺伝子として同定され、ヘテロ 2 量体を形成し、シトステロールのような植物性ステロール吸収を調節するトランスポーターであると推測されている。また、ABCG1 に関してはマクロファージからコレステロールを逆輸送することによりコレステロールの過剰蓄積を調節するトランスポーターであると推測される。

## 8.8 トランスポーターの遺伝子多型

薬物トランスポーターの薬物体内動態への影響は、その発現レベルと分子自体の機能に依存する。薬物トランスポーターの発現は内因物質ばかりでなく薬剤を含む外界物質 (異物) によっても影響される。しかし一方、遺伝的な差異は薬剤の効果や副作用の個人差となって現れるが、そのような遺伝的な差異は薬剤のターゲット分子のほか薬物代謝酵素や薬物トランスポーターにも見られる。薬物代謝酵素に関する知見で明らかなように、遺伝的に薬物処理機能の変動する遺伝的多型によって薬効および副作用も変化する。遺伝的差異と薬物効果との関係を取り扱う研究分野の薬理遺伝学は、これまで薬物代謝 (たとえばチトクロム P450 による代謝) における差異を遺伝的原因と関連づけて理解するうえで大きく貢献してきた。また、最近の技術の発展は大量ゲノムシーケンスを可能にして、個々人の薬剤応答性の差に関係している因子である 1 塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP)

を解析するまでに至った。そのようなめざましい技術発展にあつて、薬物トランスポーターの遺伝子多型の解析と、その臨床的な意義を詳細に検討することが始まった。現在、薬物トランスポーターに関する遺伝的多型の報告はまだ少ないが、種々の遺伝病との関連で前者に関する情報は集積しつつある\*。

### 1. 胆汁酸トランスポーターの遺伝子多型

胆汁酸の腸肝循環は、肝臓に備わるナトリウムイオン依存的胆汁酸トランスポーター (NTCP)、胆管腔側細胞膜における ATP 依存的な SPGP/BSEP (ABCB11)、ならびに回腸の管腔側ナトリウム依存的トランスポーター (ASBT) を介している。この中で現在、腸管吸収に関与する ASBT の遺伝的多型が胆汁酸吸収不全の原因となることが示されている。ASBT は 348 アミノ酸からなる蛋白質であるが、胆汁酸吸収不全の家系から発見された L234P と T262M のミスセンス変異は活性低下を伴い、胆汁酸吸収不全の原因と考えられている。また、クローン病患者からも P290S 置換によってタウロコール酸輸送活性が消失する。なお、肝血管側膜 NTCP の多型性についてはまだ報告がない。胆汁酸トランスポーターが一部高脂血症治療のターゲットとしても捉えられているため、これらトランスポーターは薬効を考えるうえでも興味深い。

### 2. ヘキソーストランスポーターの遺伝子多型

ヘキソース輸送は、ナトリウム依存的な SGLT ならびに促進拡散型の GLUT トランスポーターによって生じる。肥満や糖尿病との関連でそれぞれのヘキソーストランスポーター遺伝子との関連が研究されている。グルコース/ガラクトース吸収不全の原因として SGLT1 (SLC5A1) のミスセンス変異が見いだされている。SGLT1 は 664 アミノ酸残基からなる蛋白質で、グルコースの消化管吸収を担っている。すでに SGLT1 上に 22 カ所のミスセンス変異が確認されているが、その中で 21 種類は生合成された蛋白質の細胞膜へのソーティング異常によるものである。機能欠損を伴った例は Q457R の変異であった。促進拡散型 GLUT1 (SLC2A1) や GLUT5 (SLC2A5) についても病態との関連の有無について変異解析が行われている。機能変化は伴わないものの、GLUT1 遺伝子の多型が多くの NIDDM や肥満患者に検出されている。血液脳関門におけるグルコース輸送が GLUT1 遺伝子多型に

\* 1塩基多型 (SNP) : 薬剤応答性の差は、薬剤ターゲット分子 (受容体, イオンチャネル, 酵素など) と薬物動態関連蛋白質 (薬物代謝酵素, 薬物トランスポーターなど) の遺伝子多型と発現量に関連する。遺伝子多型とは全個体数中 1% 以上の頻度で存在するゲノムの多様性のことで、1~数十の塩基の置換, 欠失もしくは挿入, あるいは反復配列における繰返し回数の違いなどが知られている。一方、個々人の表現型の多様性に関係していると考えられている因子、1塩基多型 (SNP) はヒトゲノムにおいて平均して 1900 bp ごとに 1 個の頻度で存在し、すべてのゲノム中には 300 万個のオーダーで存在すると考えられている。ヒトゲノムの SNP は膨大な量の情報をもたらす、医療や創薬のパラダイムを大きく変える可能性があると考えられている。現在までにヒトゲノムにおいては 142 万個以上の SNP の情報が蓄積している。そのうち約 6 万個はエクソンにあると推定されている。

SNP 共同研究組織 (The SNP Consortium : TSC) はヒト SNP を解析するために 1999 年 4 月 15 日に設立された非営利団体である。当初は Wellcome Trust と製薬企業 10 社 (AstraZeneca, Aventis, Bayer, Bristol-Meyers Squibb, Hoffmann-LaRoche, Glaxo Wellcome, Novartis, Pfizer, Searle, SmithKline Beecham) で始まり、現在 Amersham Pharmacia Biotech, IBM, Motorola のほか公的研究機関 (Whitehead 生物医学研究所, Washington 大学 St. Louis 校医学部, Sanger センター, Stanford 大学ヒトゲノムセンター, Cold Spring Harbor 研究所) が参画している。SNP 解析結果はホームページ <http://snp.cshl.org> で順次公開されている。また、NCBI (National Center for Biotechnology Information) もデータベース dbSNP を構築してウェブ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) を通して公開している。NCBI のデータベース dbSNP は GenBank, PubMed, LocusLink, Human Genome Project といった他の情報ソースとも連携する方針であり、疾患原因や薬剤応答性との関連情報を得るうえで有効な情報源となる。

よって影響されることが示されている。

### 3. 神経伝達物質トランスポーターの遺伝子多型

ドーパミントランスポーター (DAT1, SLC6A3) とセロトニントランスポーター (SERT) は、パーキンソン病やアルツハイマー病あるいは精神性疾患との関わりで、最もその遺伝子多型研究が行われているトランスポーターである。DAT1 および SERT はそれぞれ 662 および 654 アミノ酸残基からなる蛋白質で、ナトリウム依存的にシナプス間隔からの取り込みに働く。多くの遺伝的多型性が報告されているが、それらの神経作用や向精神薬感受性との関係も興味をもたれている。トランスポーターがドラッグターゲットとなっていることから、体内動態のみならず薬理作用という点からも遺伝子多型との関係が重要である。

### 4. 有機イオントランスポーターの遺伝子多型

薬物動態的に ABC トランスポーターと並んで最も重要なヒトの有機イオントランスポーターには、有機アニオントランスポーターとして OATP, OAT, ならびにモノカルボン酸トランスポーター (MCT) が、また有機カチオントランスポーターとしては OCT ならびに OCTN があげられる。また、ペプチドトランスポーターとして PEPT がある。現在 ABC トランスポーター以外の薬物トランスポーター群に関する遺伝的多型の情報はごく限られている。

MCT1 は 500 アミノ酸残基からなる蛋白質で、前述したようにプロトン勾配を駆動力として乳酸、ピルビン酸ならびに短鎖脂肪酸を生理的基質として輸送するが、安息香酸のようなモノカルボン酸系化合物の輸送にも働く。また、小腸や血液脳関門を含む多くの組織に発現するためその物質交換における役割は大きいものと推測される。MCT は乳酸やピルビン酸代謝に関わり血球や筋肉組織で機能することから、その異常は運動機能に影響すると考えられた。そこで、赤血球の乳酸輸送活性とともに MCT1 (SLC16A1) 遺伝子多型を調べたところ、数種の変異アリルが見いだされた。対象者 5 人において見いだされた変異は K204E 置換、G490R 置換ならびに E490D 置換であった。最初の 2 種類の変異は乳酸輸送活性が低下し、3 番目の変異は機能変動をほとんど起こさない多型であることが示唆されている。

有機アニオントランスポーター (OATP) 群は、多様なアニオン性薬物、生体内外の種々抱合代謝物を輸送し、肝臓、腎臓、血液脳関門など組織分布も多岐にわたるため薬物動態的にきわめて重要である。現在わかっている生理機能としては、OAT が肝臓での尿中分泌に重要なものに対して、OATP は胆汁中排泄における重要性が指摘されており、OAT に比べ分子量が大きく、しかも脂溶性が高い化合物を輸送する傾向がある。肝臓における異物胆汁排泄において特に血管側膜輸送に寄与する OATP-C (SLC21A6, LST-1 あるいは OATP-2) については遺伝的多型が報告されている。OATP-C は 691 アミノ酸残基からなる蛋白質で、肝実質細胞血管側膜に局在している。本遺伝子は 1999 年から 2000 年にかけて 4 グループによってクローニングされた。2001 年に 7 種の多型が見つかり、いずれもエストロン硫酸抱合体の輸送能が低下していた。

有機カチオントランスポーター (OCT) は肝臓 (OCT1) や腎臓 (OCT2) の血管側膜におけるカチオン性物質輸送に働く。OCT と相同性を有する ORCTL2S に遺伝的多型が報告されているが、ORCTL2S 自体の機能も明確とはいえず、多型の影響は不明である。

## 5. カルニチン/有機カチオントランスポーター OCTN2 の遺伝子多型

有機カチオントランスポーターに分類される OCTN2 (SLC22A5) は、生理的には脂肪酸代謝に必要なカルニチン輸送に働いていることが明らかになっている。本遺伝子は第5染色体の5q31に位置し、同じく第5染色体上の有機カチオントランスポーター OCTN1 (SLC22A4) と非常に近接しており、25,871塩基対からなる10のエクソンによって構成され、557アミノ酸残基からなる蛋白質である。本遺伝子は全身性カルニチン欠乏症 (SCD) モデル動物 *juv* マウスにおける病因遺伝子の第11染色体上と syntenic であり、*juv* マウスの病態発症遺伝子としてマウス *octn2* 遺伝子変異が同定された。一方、SCDは重篤な場合には小児致死性であるため、以前よりその原因遺伝子の解明が待たれており、その患者ならびに家系の OCTN2 遺伝子解析によって、ヒト SCD 原因遺伝子であることが実証されるに至った。現在までに、SCD 患者・家系解析によって約20種類の機能変動を伴う OCTN2 遺伝子変異が見いだされている。1塩基変異、欠失・挿入変異、スプライス部位変異など多様な変異が見られている。1塩基変異による1アミノ酸置換では実際にどのようなメカニズムで機能低下が生じているのか明らかではない。

トランスポーター機能の低下原因として、蛋白質としての機能は維持されながらも細胞膜へのソーティング異常を伴うことが多く、これはヘキソーストランスポーター変異によるグルコース/ガラクトース吸収不全や白人で多発する嚢胞性線維症 (CFTR) 遺伝子の遺伝子変異による機能低下において多く見られる。OCTN2の薬物動態的重要性はまだ十分解明されていないが、OCTN2は腎尿細管上皮細胞管腔側膜でナトリウム依存性なカルニチン再吸収に働く一方で、テトラエチルアンモニウム (TEA) のような有機カチオンをナトリウム非依存的に輸送する。現在、尿細管上皮細胞血管側膜では OCT のような膜電位依存性なトランスポーターに対して、管腔側膜ではプロトンとのアンチポーターの存在が考えられているがその実態は解明されていない。マウス *octn2* 変異をもつ *juv* マウスにおける TEA の体内動態解析の結果、TEA の尿中への分泌クリアランスが正常の半分程度まで減少する。すなわち、OCTN2が有機カチオンの尿細管分泌に対して管腔側膜で寄与するものと推定される。したがって SCD を発症するような OCTN2 遺伝子変異によって有機カチオン性化合物の動態も変動する可能性がある。しかし、カルニチン輸送と TEA 輸送の活性変動が OCTN2 変異によって必ずしも同様の傾向を示さない場合もある。S467C 置換はカルニチン輸送活性をほぼ消失するが、TEA 輸送活性はほぼ維持される。同様に P478L 変異は高い TEA 輸送活性を発揮するが、カルニチン輸送活性はほぼ消失する。これらの結果は、OCTN2 上のカルニチンと TEA の輸送活性部位が完全には一致しないことを示唆する。前述したように、両輸送活性はナトリウム依存性という点で大きく異なっており、ナトリウムを駆動力とする2次性能動輸送機能がこのような変異では特異的に影響を受けると考えられる。また、有機カチオン輸送活性を維持した状態でカルニチン輸送活性が消失することは変異メカニズムとして合成された蛋白質の細胞膜へのソーティング異常では説明できず、その変異がカルニチン輸送活性を機能的に消失するタイプであることを示す。

一方、日本人の OCTN2 遺伝子の疫学的調査を行うと、OCTN2 遺伝子の種々の変異を約100人に1人の割合でヘテロに有する可能性も指摘されている。ヘテロに変異アリルを有する場合は、カルニチン輸送活性は約半減することから、有機カチオン輸送活性も同様な変動をひき起こす可能性があり、さらに OCTN2 の有機カチオン分泌との関係を明らかにする必要がある。

## 6. ABCトランスポーターの遺伝子多型

ABCトランスポーター遺伝子の変異が遺伝病と関連することが、これまでの研究で明らかになってきた。表8.4は、ABCトランスポーターの分類とともに、その遺伝子の変異が原因となって引き起こされる疾患を示した。Dubin-Johnson 症候群は、肝臓の胆管腔側膜に発現する cMOAT/MRP2 (ABCC2) の遺伝子変異によって、薬物代謝物 (グルタチオン, グルクロン酸, 硫酸抱合体) やビリルビンなど有機アニオンを胆汁中に排泄する機能に障害が起こり発生した疾病である。Dubin-Johnson 症候群の遺伝形式は常染色体劣性で、まれな疾病である (日本人では 100 万人に 1 人の頻度で起きる)。桑野らの研究グループは、Dubin-Johnson 症候群をもつ日本人の 6 家系 7 人の患者の遺伝子を解析して 4 種類の変異を同定した。2302 (C → T) 変異は 768 番目のアルギニンがトリプトファンに変異し、4145 (A → G) 変異は 1382 番目のグルタミンがアルギニンに変異する。1815+2 (T → A) と 2439+2 (T → C) 変異はそれぞれエキソン 13 と 18 がスキップする。そのいずれも ATP 結合部位とその近傍で起きる変異であり、これらの変異によって cMOAT/MRP2 (ABCC2) の機能が失われるものと考えられる。また、膜貫通領域にも、R768W 変異と 2439+2 (T → C) 変異および R1006Stop が見いだされている。

一方、胆管腔側膜に発現する SPGP/BSEP (ABCB11) の変異も報告されている。SPGP (ABCB11) は 1321 アミノ酸からなり、P 糖蛋白質 (ABCB1) の姉妹として同定された胆汁酸分泌に働く ABC トランスポーターであるが、その 1 塩基変異が遺伝的胆汁うっ滞病 2 型 (progressive familial intrahepatic cholestasis 2 : PFIC2) と関連することが報告されている。また、遺伝的胆汁うっ滞病 3 型の患者では、リン脂質を輸送する MDR3 (ABCB4) の遺伝子変異 (塩基対の欠落, フレームシフト, ストップコドンの導入) が見つけられている。

薬物輸送に大きく関与する P 糖蛋白質 (ABCB1) に関して、健康人に遺伝子多型が見つかっており、薬剤の吸収・分布・排泄への効果が示唆されている。しかしながら、P 糖蛋白質 (ABCB1) およ

表 8.6 P 糖蛋白質 (ABCB1) の遺伝子多型

位置	アリル位置	アミノ酸位置	アミノ酸変異	SNP	頻度 (%)		個体数 N
					ヘテロ	ホモ	
Exon1	12			T/C	11.8	0	85
Exon2	-1			G/A	11.2	0	188
Exon2	61	21	Asn → Asp	A/G	17.6	0.5	188
Intron	-25			G/T	26	3.5	85
Intron	-35			G/C	1.2	0	85
Exon5	307	103	Phe → Leu	T/C	1.2	0	85
Intron	139			C/T	48.2	16.5	85
Intron	145			C/T	2.4	0	85
Exon11	1199	400	Ser → Asn	G/A	12.9	0	85
Exon12	1236			C/T	48.9	13.3	188
Intron	44			C/T	11.7	0	188
Intron	-76			T/A	45.9	22.4	85
Intron	137			A/G	1.2	0	85
Exon26	3435			C/T	48.3	23.9	188
Exon26	3396			C/T	0.53	0	188

びそれ以外の薬物トランスポーターの遺伝子多型の臨床的意義について、現在まだ十分には検討されていないのが現状である。最近、ヒト P 糖蛋白質 (ABCB1) をコードする *MDR1* 遺伝子にはいくつかの遺伝子多型があるという興味深い証拠が報告された (表 8.6)。中でも特に *MDR1* 遺伝子の 26 番目のエクソンにある C→T 変異は P 糖蛋白質 (ABCB1) の発現レベルと密接に相関していることが示された。ただし、この変異はアミノ酸の変異を伴わない。いずれにしても C→T 変異をホモ型でもつヒトでは、十二指腸での P 糖蛋白質 (ABCB1) の発現レベルが低く、経口投与したジゴキシンの血中濃度が高い。そのため、この遺伝子多型が P 糖蛋白質 (ABCB1) の基質の吸収や組織濃度に影響を与えている可能性が示唆されている。なお、現在 NCBI に登録されている P 糖蛋白質 (ABCB1) 遺伝子の SNP データには、上記以外の SNP も含まれており、複数の遺伝子多型があるものと考えられる。

一方、健常な日本人 48 人を対象とした SNP 解析が P 糖蛋白質 (ABCB1)、MRP1 (ABCC1)、cMOAT (MRP2, ABCC2) について家入らによって行われた。母集団が小さいので頻度解析はできないが貴重なデータであることには異論がない。詳細な頻度解析と機能解析の結果は、今後ファルマスニップコンソーシアム\*による大規模集団 (健常な日本人約 1000 人を対象) に基づいた SNP 解析研究で明らかになるであろう。

## 8.9 薬物輸送機構に基づく創薬分子デザインの例：P 糖蛋白質 (ABCB1) の基質にならない新規抗がん薬の探索

製薬企業にとっては、薬物トランスポーターの基質にならず、かつ遺伝子多型に左右されない創薬分子デザインをすることが重要である。ここでは薬物輸送機構に基づく創薬分子デザインの一例を紹介する。多剤薬物耐性はがんの化学療法にとって克服すべき重要な問題である。分子生物学的および生化学的方法によってその機構が詳細に解明されて、P 糖蛋白質 (ABCB1) や MRP (ABCC1)、BCRP (ABCG2) といった能動的薬物排出トランスポーターが発見されてきた。これらのトランスポーターが過剰に発現すると薬物排出能力が上昇して、がん細胞内での制がん薬の蓄積が著しく低下する。それにより、がん細胞は増殖し続け患者は死に至る。

ドキシソルピシンとダウノルピシンは最初に臨床応用が認可されたアントラサイクリンであり、エピルピシンは最近市場に出た制がん薬である。これら 3 つの薬は現在広くヒトのがんの化学療法に使用されているが、P 糖蛋白質 (ABCB1) によってヒトがん細胞からすぐに除去されるので P 糖蛋白質が

\* ファルマスニップコンソーシアム (PSC)：日本人あるいはアジア人にも特有の遺伝子多型があって、それらが薬剤応答性に関与する可能性がある。2000 年 9 月 6 日に、日本製薬工業協会加盟 81 社のうち 43 社はファルマスニップコンソーシアム (PSC) を発足させて、日本人の薬物動態関連遺伝子多型に関する研究を開始した。この PSC は、わが国初の製薬業界主導による共同研究機構である。PSC では組織内に倫理審査委員会を設置して、倫理面のマニュアルを整備し、企業でゲノム研究を実施するうえで必要な試料などの入手に関連した環境整備を行うことも重要な目的としている。平成 12 年度から平成 14 年度までの 3 年間、10 億円の予算 (43 社の出資) で研究を行う予定である。このプロジェクトにおいて、日本人ボランティア約 1000 人による血液試料を用いて、約 180 個の薬物動態関連遺伝子の SNP を同定し、その SNP について頻度解析を行う。さらに、アミノ酸の変異を導く SNP に関しては、変異型蛋白質を発現させて、その機能解析を行う。また、日本人の薬剤反応性研究に必要な共通基盤データを整備するため、得られた成果をデータベース化する。なお、構築したデータベースは公開を原則とし、国内外の医療の発展に貢献するとともに、提供試料の一部を不活化して公的なバンクに委託することにより、わが国の産官学、あらゆる研究機関において利用できるようにする計画である。PSC のホームページ <http://www.psc.gr.jp>



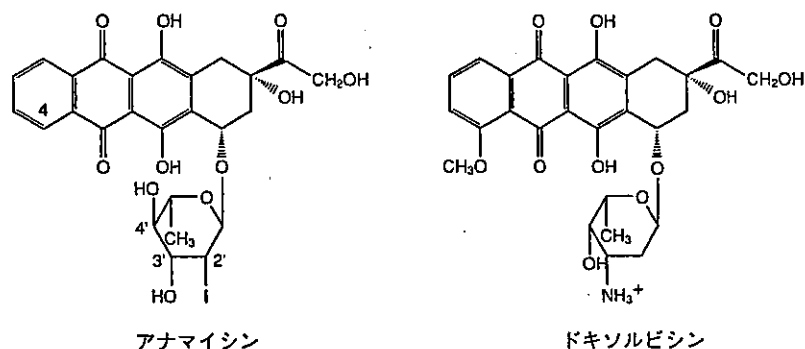


図 8.7 ドキソルビシンとアナマイシンの化学構造

過剰発現した耐性がんではほとんど効き目がない。この治療上の問題を解決するために、P糖蛋白質 (ABCBI) の基質認識の性質を考慮しながら、より効果的なアントラサイクリンの模索を試行した。その結果、アナマイシンという新規の制がん薬を得るに至った (図 8.7)。

アナマイシンの分子設計と合成に至るまでの過程においては、P糖蛋白質 (ABCBI) の基質認識の性質から、アントラサイクリンの3'位のアミノ基がP糖蛋白質の輸送機構に重要な分子構造上の要素であると示唆された。したがってアナマイシンでは、その3'位のアミノ基を水酸基に置換してP糖蛋白質による基質認識を回避した。さらに、脂溶性を増加させてリポソームに取り込ませるためと、トポイソメラーゼの阻害能力を強化するために、構造上の変換を試みた。それはすなわちC-4位のメトキシ基を除去し、C'-2位にヨードを導入することであった。薬をリポソームに取り込ませるのは、がんへのターゲティングを上昇させることと、脳移行を抑え、かつ心臓毒性などの副作用を軽減するためである。

P338 (感受性) と P338/DOX (多剤耐性) がん細胞を用いてアナマイシンの薬理効果をドキソルビシンと比較した結果、感受性細胞ではアナマイシンはドキソルビシンとほぼ同等に活性であったが、多剤耐性細胞においてはアナマイシンはドキソルビシンより50~100倍高い薬理効果が観測された。また、アナマイシンの細胞内蓄積は、感受性細胞と多剤耐性細胞の両方において、ドキソルビシンよりも高かった。ドキソルビシンがP糖蛋白質によって多剤耐性細胞から速やかに排出されるのと対照的に、アナマイシンの排出は感受性細胞、多剤耐性細胞とも同様に緩やかであった。このことはアナマイシンがP糖蛋白質の基質にならないことを強く示唆している。さらに、アナマイシンの取り込みと細胞内蓄積は、典型的な耐性抑止薬 (シクロスポリンなど) によって影響を受けなかった。興味深いことには、組織およびがん部位へのアナマイシン、リポソーム包埋アナマイシン、ドキソルビシンの取り込みに関してB16メラノーマ腫瘍を皮下にもつC57BL/6マウスを用いて比較した結果、心臓を除いた各組織でアナマイシンのレベルはドキソルビシンよりも高かった。また、がん部位のアナマイシンとリポソーム包埋アナマイシンのレベルはAUCに換算してそれぞれ2倍と5倍ドキソルビシンのレベルより高かった。

最後に、フリーのアナマイシンとリポソームに包埋したアナマイシンの生体内での制がん活性を3種類の腫瘍モデル (M5076 reticulosarcoma, Lewis肺がん細胞, 皮下KB-3-1とKB-V1 xenografts) で検証した。図 8.8 はLewis肺がんをもつマウスで、フリーのアナマイシン (4mg/kg) とリポソーム包埋アナマイシン (4mg/kg) とドキソルビシン (10mg/kg) を投与したものの生存率の経過を示す。

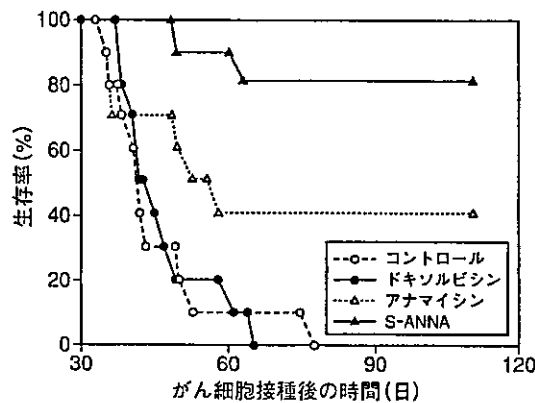


図 8.8 P 糖蛋白質を過剰発現する Lewis 肺がんを移植したヌードマウスで、フリーのアナマイシン (4 mg/kg) と小リボソーム包埋アナマイシン (S-ANNA 4 mg/kg) ならびにドキソルビシン (10 mg/kg) を投与したものの生存率の経過

生存率から見ると、アナマイシンは明らかにドキソルビシンよりも優れており、かつリボソーム包埋はさらに効果があった。このように薬物トランスポート機構に基づいた創薬デザイン戦略は動物実験での試行錯誤を減らし、論理的かつ効率的な新薬の開発を可能にするのである。

おわりに 21 世紀においては、ゲノム技術 (バイオインフォマティクス, 機能ゲノム, 薬理ゲノム) が新薬探索段階でのターゲット評価と開発段階での臨床研究においてパラダイムシフトを与えるであろう。しかしながら、新薬の探索と開発は時間とコストを要する高いリスクと賭けの要素をはらむビジネスである。開発候補化合物を敏速に抽出し臨床ステージに上げるうえで大切なことは、創薬戦略を明確にし、合成のステージのごく早期から体内動態を含めたスクリーニングシステムを導入することにある。そのためには、吸収、分布、代謝、排泄の体内動態に精通し、物性や製剤特性に対する知識が要求される。

今後、医療システムが入院/通院から在宅医療重視へと変化するに従い、経口薬剤の市場が拡大すると予測される。経口薬剤として開発する場合、創薬戦略は経口後の吸収性評価系が早期に組み込まれることが重要である。in vitro と in vivo 薬効を指標に候補薬物を抽出して、それから吸収性を評価することがきわめて日常的に行われているが、吸収されないにはそれなりの理由があるので、吸収性の評価は同時並行で進めることが望ましい。小腸上皮細胞透過性が良くなければ脂溶性のプロドラッグにすればよいとの考え方は捨てるべきである。上皮細胞が吸収方向に向かないのは、取り込み速度が遅いだけでなく、トランスポーターが関与する排出速度が早いということも最近の研究で明らかになりつつある。活性型本体が排出輸送されやすい特性をもっている候補薬物の場合は、プロドラッグのアプローチは失敗するかもしれない。

創薬における実践的な方法の 1 つとして、薬物動態的に優れた薬剤を創出するトランスポート機構に基づいた創薬デザイン戦略はますます重要なものと見なされよう。このアプローチは「適切な薬を適切な患者に適切な投与量で」という医療の究極ゴールに一致するものである。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

合理的な創薬分子設計戦略とターゲット部位に特異的な薬剤デリバリーの開発に大きく貢献するものと考えられる。トランスポーターを考慮した創薬戦略に王道はないが、強い意志のもと、確実なスクリーニングシステムを構築し、得られた現象を正しく評価して、フィードバックできる体制を整えておくことが必要であり、創薬研究者は動態研究の進歩に常に目を向けて、優れた医薬品を誕生させるためのパースコントロール学を自ら会得することが要求される。

#### 参考文献

- 1) 石川智久：ゲノム創薬に何が必要か？ 現代化学, 11月号, 56-60 (2001)
- 2) 薬物トランスポーター研究の新展開. 医学のあゆみ, 179, 383-397 (1996)
- 3) 辻 彰・玉井郁巳：薬物バイオアベイラビリティ評価と改善の化学ーより良き医薬品開発のためにー (杉山雄一編集), pp. 41-78, 現代医療社 (1998)
- 4) トランスポーターの構造と機能協関. 生体の化学, 50, 258-314 (1999)
- 5) 楠原洋之・設楽悦久・大坪陽子・杉山雄一：薬物トランスポーターの分子特性一多様性と基質特異性(1). *Pharm. Tech. Japan*, 14, 957-971 (1998)
- 6) 楠原洋之・伊藤晃成・秋田英万・杉山雄一：薬物トランスポーターの分子特性一多様性と基質特異性(2). *Pharm. Tech. Japan*, 14, 1145-1155 (1998)
- 7) 石川智久, Allikmets, R., Dean, M., Higgins, C., Ling, V., Wain, H. M.: ヒト ABC トランスポーター遺伝子の新命名法. *薬物動態*, 15, 8-19 (2000)
- 8) 和田 守・内海 健・桑野信彦：ABC トランスポーター：構造と機能研究の新展開. *生化学*, 73, 537-546 (2001)
- 9) Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O. *et al.*: Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 3473-3478 (2000)
- 10) 石川智久・藪内 光・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)
- 11) 石川智久・Priebe, W.: ポストゲノム時代の挑戦：輸送機構に基づいた創薬デザイン戦略. *Global Outsourcing Review*, 2, 52-58 (2000)

Reprint from.

T. Inoue, W.D. Pennie (Eds.)  
Toxicogenomics

© Springer-Verlag Tokyo 2003  
Printed in Hong Kong. Not for Sale.

## ABC transporters: a new approach to toxicogenomics

Toshihisa Ishikawa and Megumi Yoshikawa

Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan

**Summary.** Membrane transporters play a pivotal role in drug absorption in the intestinal tract and in drug distribution to brain and other tissues, as well as in the elimination of toxic metabolites from cells. However, at present, little is known about the toxicogenomic and pharmacogenomic significance of drug transporters. In 1992, Ishikawa first proposed a new concept of the “phase III” detoxification system by emphasizing the biological importance of ATP-dependent transporters, GS-X pumps, for elimination of glutathione S-conjugates in our body (Trends Biochem Sci 7: 463-468, 1992). Since that time, more than 40 different human ATP-binding cassette (ABC) transporter genes have been discovered, and some of them have been documented to be critically involved in transport of drugs and metabolites. This review summarizes the toxicogenomic aspects of ABC transporters and the potential mechanisms underlying their gene expression.

**Key words.** ABC Transporters, Phase III detoxification system, Drug metabolism, Oxidative stress, Nuclear receptors

### Paradigm shift of drug discovery strategy

In the last decade of the 20th century, the development of high throughput screening (HTS) and combinatorial chemistry technologies accelerated the drug discovery process. In the 21st century, emerging genomic technologies (i.e., bioinformatics, functional genomics, and pharmacogenomics) are shifting the paradigm for drug discovery and development. However, the attrition of drug candidates in preclinical and development stages is a major problem in drug development. In about fifty percent of cases, this attrition is due to toxicity and poor pharmacokinetics (e.g., limited absorption, low plasma concentration levels, high rates of clearance). Because of increasing costs of genome-based drug discovery, pharmaceutical companies have begun to seriously re-evaluate their current strategies of drug discovery and development.

Hitherto we have been developing on a unique approach to pharmaco-

genomics and toxicogenomics in drug discovery research. Our strategy sprang from the realization that, in the near future, the processes of drug discovery and development will be dramatically changed by the introduction of new research technologies such as bioinformatics, functional genomics, and pharmacogenomics and their use to identify both classical drug targets (e.g., enzymes, membrane-bound receptors, and ion channels) and novel drug targets (e.g., cellular components of signal transduction, nuclear receptors, mRNA, and DNA). As a result organ-specific drug targeting and delivery will become increasingly important in ensuring the site selectivity and pharmacological activity and reducing the toxic effects of new molecular drug candidates aimed at those targets.

### Importance of drug transporters

Accumulating evidence strongly suggests that drug transporters are critically involved in drug absorption, distribution and elimination, thereby affecting drug concentrations at the target site. In this context, both drug transporters and drug metabolizing enzymes can determine the pharmacokinetic profiles and overall pharmacological effects of drugs. Fig. 1 schematically illustrates the function of drug transporters in influx and efflux of drugs, as well as in elimination of toxic metabolites from cells.

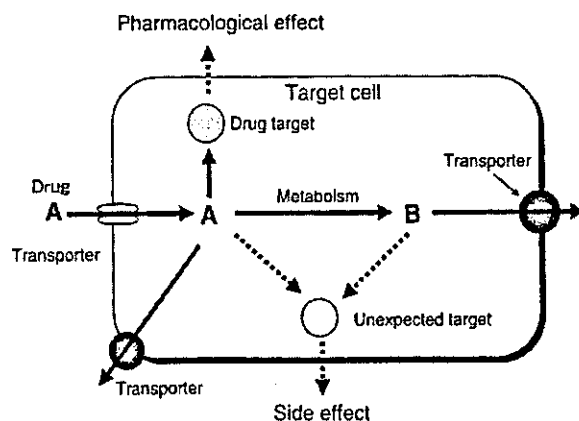


Fig. 1. Drug transporters and drug metabolizing enzymes in the drug-targeting cell.

Drug transporters expressed in epithelial cells of the small intestine and in brain capillary endothelial cells greatly affect the oral bioavailability of drugs and drug penetration into the central nervous system. Many of drug transporters belong to the ABC transporter family. This family of human ABC transporters is now known to contain about 50 members, most of whose genes have been identified and sequenced (Ishikawa et al. 2000a; Ishikawa et al. 2001).

ABCB1 (P-glycoprotein, MDR1), ABCC1 (GS-X pump, MRP1), ABCC2 (cMOAT, MRP2), and ABCG2 (BCRP, ABCP), in particular, are gaining attention for their involvement in drug absorption by the small intestine and drug penetration into the brain; they are expressed in a variety of normal cells and organs, and its modulation in these tissues can influence the activity and bioavailability of drugs. In the intestine, for instance, modulation of ABCB1 may control the degree of drug uptake after drug ingestion. At the blood-brain barrier, high ABCB1 expression levels can limit the uptake of desired drugs into the brain; conversely, low ABCB1 activity can lead to abnormally increased accumulation and undesirable side effects.

### ABC transporters in phase III detoxification system

Metabolism of xenobiotics including drugs is widely referred to phase I and II systems, where phase I includes oxidation of xenobiotics and phase II deals with the conjugation of phase I products (Fig. 2). The oxidative metabolism in the phase I system is mediated by cytochrome P-450 (CYP) or flavin mixed-function oxidase. Some of activated xenobiotics can interact with DNA and/or proteins in cells to cause toxic effects. In the phase II system, on the other hand, activated hydrophobic xenobiotics are converted into hydrophilic forms via conjugation reactions with glutathione, sulfate or glucuronide. This phase II metabolism is regarded as the detoxification process of xenobiotics. However, in some cases, the phase II system is a critical step in the formation of genotoxic electrophiles. Furthermore, accumulation of the resulting metabolites in cells can lead to a decrease in the detoxification activity of the phase II system. Therefore, the phase III system must take a task to eliminate Phase II metabolites from cells. Several ABC transporters, including ABCB1, ABCC1, ABCC2 and ABCG2, are considered to be major players in the phase III detoxification system (Ishikawa 1992; Ishikawa et al. 2000b.)

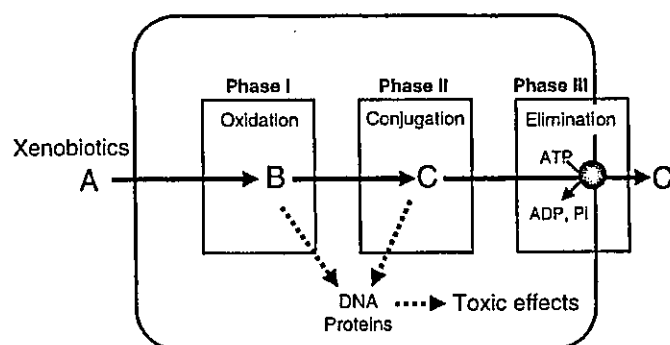


Fig. 2. Schematic illustration of phase I, II, and III detoxification systems.

## Regulation of ABC transporter gene expression

Gene regulation of drug metabolizing enzymes and drug transporters is of great interest to understand the molecular mechanisms of drug response and toxic events. Recent studies have revealed that hydrophobic ligands and several nuclear receptors are involved in induction or down-regulation of cytochrome P-450 isoforms and ABC transporters (Chawla et al. 2001) (Table 1). While the gene regulation of drug metabolizing enzymes, such as cytochrome P-450, glucuronide transferases and glutathione transferases, have been well characterized, studies on the molecular mechanisms underlying the induction and down-regulation of drug transporters have just started most recently.

**Table 1.** Nuclear receptor-ligand interaction and expression of cytochrome P-450 (CYP) isoforms and ABC transporters.

Ligand	Nuclear receptor	CYP	ABC transporter
Xenobiotics Phenobarbital	CAR	CYP2B(+) CYP2C(+)	ABCC3 (+)
Xenobiotics Steroids	SXR/PXR	CYP3A (+) CYP2C (+)	ABCB1 (+) ABCC2 (+)
Bile acids	FXR	CYP7A1 (-) CYP8B1 (-)	ABCB11 (+)
Oxysterols	LXR $\alpha,\beta$	CYP7A1 (+)	ABCA1 (+) ABCG1 (+), ABCG4 (+) ABCG5 (+), ABCG8 (+)
Fatty acids Fibrates	PPAR $\alpha$	CYP4A1 (+) CYP4A3 (+)	ABCD2 (+), ABCD3 (+) ABCB4 (+)
Fatty acids Carboprostacyclin	PPAR $\delta$	?	?
Eicosanoids Thiazolidinediones	PPAR $\gamma$	CYP4AB (+)	?
Retinoic acids	RAR $\alpha,\beta,\gamma$	CYP26A1 (+)	ABCG4 (+)
1,25(OH) $_2$ - vitamin D $_3$	VDR	CYP24 (+) CYP27B1 (-)	?

(+) up-regulation; (-) down-regulation.

Our previous studies have demonstrated that ABCC1 expression was up-regulated by heavy metals, oxidative stress and interleukin 1 $\beta$  (Ishikawa et al. 1996; Yamane et al. 1998; Ikegami et al. 2000). The ABCC1 gene contains core

consensus sequences for ARE (antioxidant response element) and AP-1 (activator-protein-1) binding site (Fig. 3). These sequences were also found in the 5' flanking sequence of a gene encoding the active subunit of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS), a rate limiting enzyme of glutathione biosynthesis. It is important to note that the ABCC1 gene encodes the GS-X pump which transport a variety of glutathione conjugates. Coordinated up-regulation of ABCC1 and  $\gamma$ -GCS genes was frequently observed in human colorectal cancers as well as in various cancer cell lines (Kuo et al 1996). Involvement of those core consensus sequences in the induction of ABCC1 and  $\gamma$ -GCS in normal cells and tissues remains to be elucidated.

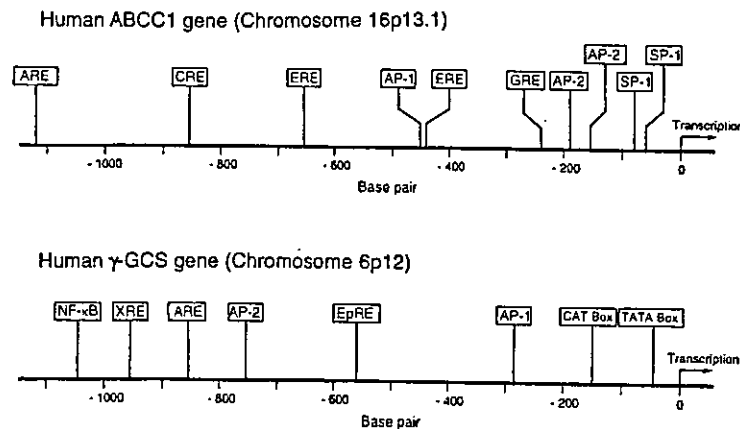


Fig. 3. Potential regulation sites in the promoter regions of human ABCC1 and  $\gamma$ -GCS genes. CRE, cyclic AMP response element; ERE, estrogen response element; GRE glucocorticoid response element, XRE, xenobiotic response elements, EpRE, Electrophile response element; CAT box, CCAAT box.

## Genetic polymorphism of ABC transporters

The effects of drug transporters on the pharmacokinetic profile of a drug depend on their expression and functionality. Indeed, the expression of drug transporters can be modulated by endogenous and exogenous factors, including drugs, themselves. It is also now known that inherited differences among individuals may also affect drug efficacy and toxicity. Such inherited differences include genetic polymorphisms in drug targets and drug-metabolizing enzymes, as well as in drug transporters. Hitherto, pharmacogenetics, the field dealing with such inherited differences and their effect on pharmacokinetics, has significantly contributed to our understanding of genetic causes underlying differences in drug metabolism (e.g., cytochrome P-450 mediated drug metabolism). In fact, recent technological advances allowing massive molecular sequencing have in turn allowed a



consortium of researchers to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) as one possible cause of variable drug response among individuals. The SNP consortium plans to complete a high-density map of SNPs and make it openly available to the public (<http://snp/cshl/org>). In Japan, on the other hand, the Pharma SNP consortium (PSC) consisting of 43 pharmaceutical companies is currently investigating SNPs of drug metabolizing enzymes and drug transporters to obtain insight into the cause of individual differences in drug response (Gushima 2001; Ishikawa et al. 2001). In this context, it would become increasingly important to carefully examine the clinical significance, if any, of polymorphisms of drug transporter genes in light of both pharmacokinetic and toxicogenomic aspects.

## References

- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: Opening the X-files. *Science* 294: 1866-1870
- Gushima H (2001) Japanese industry takes steps toward genomics-based medicine. *Global Outsourcing Review* 3: 30-37
- Ikegami Y, Tatabe S, Lin-Lee Y, Xie Q, Ishikawa T, Kuo MT (2000) Induction of MRP1 and g-glutamylcysteine synthetase gene expression by interleukin 1b is mediated by nitric oxide-related signaling in human colorectal cancer cells. *J Cell Physiol* 185: 293-301
- Ishikawa T (1992) The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* 17: 463-468
- Ishikawa T, Bao JJ, Yamane Y, Akimaru K, Frindrich K, Wright CD, Kuo MT (1996) Coordinated induction of MRP/GS-X pump and g-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. *J Biol Chem* 271: 14981-14988
- Ishikawa T, Allikmets R, Dean M, Higgins C, Ling V, Wain HM (2000a) New nomenclature of human ABC transporters. *Xenobio Metabol Dispos* 15: 8-19
- Ishikawa T, Kuo MT, Furuta K, Suzuki M (2000b) The human multidrug resistance-associated protein (MRP) gene family: From biological function to drug molecular design. *Clin Chem Lab Med* 38: 893-897
- Ishikawa T, Yabuuchi H, Kasamatsu S, Yoshikawa M, Ikegami Y (2001) Pharmacogenomics in drug discovery and development research. *Xenobio Metabol Dispos* 16: 353-363
- Kuo MT, Bao JJ, Curley SA, Ikeguchi M, Johnston DA, Ishikawa T (1996) Frequent coordinated overexpression of the MRP/GS-X pump and g-glutamyl-cysteine synthetase genes in human colorectal cancers. *Cancer Res* 56: 3642-3644
- Yamane Y, Furuichi M, Song R, Yan NT, Mulcahy T, Ishikawa T, Kuo MT (1998) Expression of multidrug resistance protein/GS-X pump and g-glutamylcysteine synthetase genes is regulated by oxidative stress. *J Biol Chem* 271: 31075-31085

# 9

## トキシコゲノミクスと遺伝子多型解析 —ゲノム創薬から個の医療に向けて

個々の患者間で薬の有効性と副作用に差が認められ、ときには重篤な問題が引き起こされる場合がある。薬効/副作用における個人差の原因として、患者のもつ遺伝的変異や多型、薬物相互作用、環境の影響、疾患の重症度、他の疾患との併存などがあげられる。近年のヒトゲノム研究から新しい技術が開発され、薬の有効性と副作用における個人間の差が次第に解明されようとしている。迅速な配列解析と一塩基多型 (single nucleotide polymorphism ; SNP) の機能解析研究は、将来、薬剤応答性における臨床上の表現型と遺伝的な多型とを結びつけるのに重要な役割を担うであろう。

### はじめに

創薬は、有機合成化学、分子生物学、薬理学、生化学、バイオインフォマティクスなどからなる学際領域研究であり、薬理活性分子を創出して人類に恩恵を与える学問である。新規創薬ターゲットの評価法および毒性の分子機構 (細胞内シグナル伝達経路) の解明と、それに基づいた予測方法の確立、薬物動態的に優れた薬剤を創出するトランスポート機構に基づいた分子デザインの研究などは、産業界ばかりでなく、学術界においても新しい研究の潮流を起こすものと考えられる。将来「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を達成するには、個々の患者における薬剤応答の差異および副作用の根底をなす未知の分子機構について研究することが重要である。

個の医療を目指す戦略の一つは、薬効または安全性を向上させることである。なぜならば、たとえ現在最高の薬といえども、患者全員を 100 % 副作用なしに治療することはできないからである。患者間における薬物応答性の差の原因として、次のようなものがあげられる：病気の分子メカニズ

ム、環境の影響、病気の状態と重篤さ、薬物相互作用、患者個人の健康状態 (正常臓器の機能) や病気の流行など。1962 年以来、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、トランスポーター、ホルモン、受容体) における遺伝的多様性が解明されてきている。遺伝子の多様性が薬効と関係するほかに、重篤な副作用にも関係することがわかってきた。本章では、それら遺伝子の多様性に起因する副作用を概観した後、副作用予測の新しい技術について述べる。

### 薬剤応答性と副作用

薬剤応答性における個人間の差は、臨床および創薬の現場では重大な問題の一つである。薬剤応答性の差により、副作用、最悪の場合には致死ケースにまで発展することがある。入院患者の重篤および致死副作用 (adverse drug reaction ; ADR) に関して、最近詳しい研究分析がなされた。米国の病院での 39 にのぼる調査報告書の分析から、患者の 6.7% の人達が重篤、0.32% の人達が致死副作用を経験していることが明らかになった。後者の場合、米国全体で約 10 万人

**QTc 延長\*および肝毒性のために市場から撤退した薬**

薬名	薬効分類	撤退の理由
Grepafloxacin	キノロン系抗菌薬	QTc 延長
Cisapride	消化管運動改善剤	QTc 延長
Terfenadine	非鎮静性抗ヒスタミン剤	QTc 延長
Astemizole	抗ヒスタミン剤	QTc 延長
Mibefradil	カルシウム拮抗薬	QTc 延長
Encainide	抗不整脈薬 (Ic 群)	不整脈
Temafloxacin	ニューキノロン系抗菌薬	腎毒性/肝毒性
Zomepirac	非ステロイド性抗炎症薬	肝毒性
Bromfenac	非ステロイド性抗炎症薬	肝毒性
Benoxaprofen	非ステロイド性抗炎症薬	肝毒性
Ticrynafen	利尿剤	肝毒性

の患者が薬の副作用で死亡していることになる。

表 9-1 は、承認された薬のうち市場から引き上げられた薬の例を示す<sup>2)</sup>。承認された薬を市場から引き上げる主要な要因として、心電図に表れる QTc 反復時間の延長と、肝臓に対する毒性があげられる。いったん重篤な副作用が起きると、治験中の新薬候補化合物の臨床開発を中止したり、また承認された薬を市場から引き上げたりしなくてはならない。それは、患者に対する安全性確保に加えて、製薬企業の経営にとっても、重大な問題である。

### 最近の副作用ケース

肺癌治療薬ゲフィチニブ (商品名イレッサ) を投与した患者の副作用による死者が、2002 年 12 月中旬までに全国で 100 人を越えた (日本経済新聞 2002 年 12 月 30 日)。イレッサは AstraZeneca 社が開発した抗癌剤で、肺癌などの固形癌細胞の表面に発現している癌細胞増殖受容体 EGFR (epidermal growth factor receptor) に作用して、癌の増殖を抑制する作用をもつ。従来の抗癌剤のように癌細胞以外に正常細胞にも作用することなく、イレッサは EGFR に特異的に作用するために、副作用がほとんどないと考えられてい

た。実際、臨床試験でも、骨髄抑制など従来型の副作用はほとんどなかった。イレッサの投与の約 2 割、約 4,000 人の患者には治療効果が出ているとみられている。ところが肺障害の多発という予期せぬ事態にみまわれた。肺障害の発症者の患者全体に占める比率は 1.8% 弱。海外での臨床データよりわが国での発生率は、数倍高い。日本人の遺伝的な特性によるとの見方もあるが、詳細は不明である。

また、2001 年、米国で重篤な横紋筋融解症による死者が出ていると報告されたことを契機に、Bayer 社は世界中で「セリバスタチン」の自主回収に踏み切った (日経バイオビジネス 2001 年 12 月号, p70-72)。セリバスタチンが同類のスタチン系 (肝臓のコレステロール生合成酵素であるヒドロキシメチルグルタリル-CoA (HMG-CoA) 還元酵素を阻害する薬) に比べ、重篤な横紋筋融解症の発生率が高く、米国内で 31 人が横紋筋融解症で死亡、そのうち 12 人がゲムフィプロジル (フィブラート系高脂血症薬) の併用を受けていた。同年 8 月 9 日、FDA (米国食品医薬品局) は、Bayer 社の自主回収の決定に同意、支持すると発表した。横紋筋融解症は、骨格筋が融解、壊死して筋肉細胞成分が血液中に流出した病態で、手足が痛んだり、脱力あるいは赤色尿が

出たりするなどの症状が特徴である。日本では1999年5月に発売が開始され、2000年度におけるセリバスタチンの国内使用患者は53万人と推定され、320億円を売り上げていた。この副作用の原因については、肝臓における薬物トランスポーターが関与していることも示唆されているが、正確な分子機構はまだ十分には解明されていない。

### 臨床での副作用と遺伝子多型との関連性

薬効と重篤な副作用に関して、個々の患者間で有意な差が認められる。その差の原因には次のようなものがあげられる：疾患の分子メカニズム、環境の影響、疾患の状態と重篤さ、薬物相互作用、患者個人の健康状態（正常臓器の機能）や病気の流行など。さらに最近になって、遺伝子の多様性が薬効性と関係するほかに、重篤な副作用にも関係することがわかってきている。

遺伝子多型が、薬を使った医療にどのように影響するかは、薬の種類と性質による。臨床的に重要な遺伝子多型を同定する基準は、薬の濃度をモニターする基準（たとえば薬理効果/副作用領域、薬濃度の個人間の差、過剰投与の疑いなど）と類似している。薬物代謝酵素（たとえばCYP2D6）または、薬物トランスポーター（たとえばABCB1/P糖タンパク質/MDR1）が薬の体内動態と薬理効果にどのように影響を及ぼす役割をもつかによって、個々のPM（poor metabolizer）やUM（ultrarapid metabolizer）に投与する薬の適正量が決まる。少なくとも、CYP2D6の多型に関しては、このコンセプトに矛盾しない臨床データを提供してきた。たとえば、患者の多く（約90%）は、薬理的に有効な血中濃度である200~600 nmol/l（50~150 mg/l）を定期的に維持するのに75~150 mg/日のノルトリプチリン（nortriptyline）を必要とする。

しかし、一方、PMの患者であれば、同じ有効血中濃度に達するのに、たった10~20 mg/日でよい。それとは対照的に、UMでは300~500 mg/日か、あるいは500 mg/日以上投与量が必要である。明らかに、患者の遺伝子型と表現型の知識がなければ、PM患者であれば過剰の投与によって副作用の高いリスクにさらされることになるだろう。一方、UM患者では、投与量が少なすぎて十分な薬理効果は期待できないであろう。したがって、臨床現場での遺伝子型/表現型の測定は、薬の適正な投与量を予測するのに重要である<sup>3)</sup>。

### 薬のターゲット(受容体、酵素)の遺伝子多型

薬理効果のほとんどは、薬の化合物と膜受容体（~50%）、酵素（~30%）または、イオンチャネル（~5%）との相互作用によってもたらされる。それらの薬のターゲットをコードしている遺伝子の多くは、多型をもっており、そのため薬剤応答性に差が現れるものと考えられている。最もよく研究された薬のターゲットは $\beta_2$ アドレナリン作動性受容体（ $\beta_2$ AR）であり、その変異体（16番アミノ酸Arg→Gly）は、 $\beta_2$ アゴニストの気管支拡張作用の応答性に大きな差を与える。同様にアンジオテンシン変換酵素（ACE）の変異体は、ACE阻害剤に対する応答性の違いに関係するものと考えられているが、現在までに蓄積したデータは矛盾するものが多く、明確な解答は得られていない。一方、スルホニルウレア受容体（SUR1）の遺伝子にあるこの変異のコンビネーションで、トルブタミド（tolbutamide）に対するインスリン分泌応答に約40%の低下が起きる。また、5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体HTR2Aの遺伝子多型は、統合失調症患者のクロザピン（clozapine）に対する応答性に