

表 9-2 多型頻度を示す薬物代謝酵素

エステラーゼ

ブチリルコリンエステラーゼ
パラオクソナーゼ/アシルエステラーゼ

転移酵素 (トランスフェラーゼ)

N-アセチル転移酵素 (NAT1)
N-アセチル転移酵素 (NAT2)
カテコール-O-メチル転移酵素
ヒスタミンメチル転移酵素
チオールメチル転移酵素
チオプリンメチル転移酵素 (TPMT)
スルホトランスフェラーゼ
グルタチオン-S-転移酵素 (GSTM1)
グルタチオン-S-転移酵素 (GSTT1)
グルタチオン-S-転移酵素 (GSTM3)
グルタチオン-S-転移酵素 (GSTP1)
UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT1A1)
UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT2B4)
UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT2B7)
UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT2B15)
アモバルビタールグルコシルトランスフェラーゼ

還元酵素 (レダクターゼ)

NAD(P)H : キノンオキシドレダクターゼ
グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD)
エポキシド加水分解酵素, ミクロソーム

酸化酵素 (オキシダーゼ)

アルコール脱水素酵素, クラス I, ADH2(β)
アルコール脱水素酵素, クラス I, ADH3(γ)
アルデヒド脱水素酵素, ミトコンドリア
モノアミン酸化酵素 A (MAOA)
モノアミン酸化酵素 B (MAOB)
カタラーゼ¹²⁾
スーパーオキシドジスムターゼ
トリメチルアミン-N-酸化酵素
ジヒドロピリミジン脱水素酵素

チトクロム P-450

CYP1A1
CYP1A2
CYP2A6
CYP2B6
CYP2C8
CYP2C9
CYP2C18
CYP2C19
CYP2D6
CYP2E1
CYP3A4
CYP3A5

差を与えていると考えられている²⁾。

心臓のイオンチャネルのサブユニットをコードする 5 つの遺伝子における変異が、薬によって誘発される QT-延長症の原因と同定された。この QT-延長症は、心臓病をもたない若者の突然死の原因ともみなされている。この QT-延長症の発生比率は、約 1/10,000 と見積もられている。その 5 つの遺伝子すべては、ナトリウムまたはカリウムを通す膜チャネルをコードしており、抗不整脈薬や他の薬剤によってさまざまな影響を受ける²⁾。

薬物代謝と副作用

ヒトの体に発現する 50~100 種類の薬物代謝酵素の多くは、遺伝子多型をもつ。表 9-2 には臨床的に重要な薬剤応答性の差を引き起こす、主要な薬物代謝酵素をリストアップした。たとえば CYP2D6 においては約 100 個の薬が基質であることが知られている。同様に、CYP2C9, CYP2C19, および N-アセチル転移酵素 (NAT2) は最低 15 種類の薬を代謝する。薬物代謝酵素の遺伝子多型については、これまで多くの総説が発表されているので、本章では割愛する。

癌の化学療法における副作用

チオプリンメチルトランスフェラーゼ (TPMT) 欠損の癌患者が、メルカプトプリン (mercaptopurine), チオグアニン (thioguanine), アザチオプリン (azathiopurine) を通常の投与量で治療を受けると、重篤または致死的な骨髄毒性 (急性易熱性白血球減少, 貧血症, 汎白血球減少) が起きる。この頻度は、急性リンパ芽球腫 (acute lymphoblastic leukemia; ALL) の小児では 1/300 程度である。TPMT 欠損の患者は、致死的な骨髄毒性を避けるために、メル

表 9-3 P-gp (ABCB1) の遺伝子多型

部位	アレル位置	アミノ酸番号	置換	SNP 詳細	頻度 (%)	
					ヘテロ接合体	ホモ接合体
エクソン 1	12			T/C	11.8	0
エクソン 2	-1			G/A	11.2	0
エクソン 2	61	21	Asn → Asp	A/G	17.6	0.5
イントロン	-25			G/T	26	3.5
イントロン	-35			G/C	1.2	0
エクソン 5	307	103	Phe → Leu	T/C	1.2	0
イントロン	139			C/T	48.2	16.5
イントロン	145			C/T	2.4	0
エクソン 11	1199	400	Ser → Asn	G/A	12.9	0
エクソン 12	1236			C/T	48.9	13.3
イントロン	44			C/T	11.7	0
イントロン	-76			T/A	45.9	22.4
イントロン	137			A/G	1.2	0
エクソン 26	3435			C/T	48.3	23.9
エクソン 26	3396			C/T	0.53	0

(Hoffmeyer S et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3473, 2000⁶⁾ ; Kerb R et al. *Pharmacogenomics* 2, 51, 2001¹⁰⁾ より)

カプトプリンの投与量を通常の 1/15 にまで減らす必要がある。遺伝子多型によって癌の化学療法が影響を受ける例として次のものがあげられる：

① ジヒドロピリミジン脱水素酵素 (DPD) 欠損の患者における 5-フルオロウラシル (5-fluorouracil) の骨髄抑制と神経毒性, ② UDP-グルクロン酸転移酵素 UGT1A1 のプロモーター領域に遺伝子多型をもつ患者で, イリノテカン (トポイソメラーゼ阻害剤) を投与された際の骨髄抑制と下痢, ③ NAT2 の高いアセチル化活性をもつ患者 (白人 30 ~ 60%, アジア人 80 ~ 90%) で, トポイソメラーゼ阻害剤アモナフィド (amonaftide) を投与された際の骨髄毒性^{3, 4)}。なお, 最近になって, メルカプトプリン代謝物の輸送に, 薬物トランスポーターの一種である ABCC4 (MRP4) が関与していることが明らかになった⁵⁾。ABCC4 (MRP4) の遺伝子多型または発現量と副作用との関係は今後解明されるであろう。一方, イリノテカンの活性代謝物である SN-38 の輸送には, ABCC2 (MRP2/cMOAT)

と ABCG2 (BCRP) が関与することが報告されている⁶⁾。

薬物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遺伝子多型の研究は, 現在最も発展している研究領域の一つである。数多くの膜トランスポーターは, 小腸における薬の吸収, 脳および他の臓器への移行, 薬の作用部位 (たとえば, 神経のシナプス) への輸送などに関与する⁷⁾。薬剤応答性に対するトランスポーターの多型の研究は最近活発に行われるようになった⁸⁾。最初の報告は, 多剤耐性遺伝子である ATP 依存性トランスポーター (P 糖タンパク質, P-gp) である⁹⁾。国際新命名法では ABCB1 とよぶ。

Hoffmeyer らはヒト P-gp 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を報告した (表 9-3)。そのなかでも特に *MDR1* 遺伝子の 26 番目のエクソンにある C → T 変異は P-gp の発現レベルと

健常日本人における MRP1 (ABCC1) の遺伝子多型

部位	アレル位置	アミノ酸番号	置換	SNP 詳細	変異頻度 (%)
エクソン 2	128	43	Cys → Ser	G/C	1
エクソン 2	218	75	Thr → Ile	C/T	1
エクソン 3	825	275	Val → Val	T/C	37.5
エクソン 9	1062	354	Asn → Asn	T/C	35.4
エクソン 13	1684	562	Leu → Leu	T/C	19.8
エクソン 16	2007	669	Pro → Pro	C/T	8.3
エクソン 17	2168	723	Arg → Gln	G/A	7.3
エクソン 20	2665	889	Pro → Pro	C/T	1
エクソン 20	2694	898	Asn → Asn	T/C	1
エクソン 23	3173	1058	Arg → Gln	G/A	1
エクソン 28	4002	1334	Ser → Ser	G/A	15.6
エクソン 31	4524	1508	Tyr → Tyr	C/T	1
イントロン 9	1218+8	—	—	A/G	35.4
イントロン 11	1474-48	—	—	C/T	5.2
イントロン 18	2461-30	—	—	C/G	29.2
イントロン 18	2461-38	—	—	T/C	7.3

(Ito S et al. *Pharmacogenetics* 11, 175, 2001¹⁰⁾ より)

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、*MDR1* 遺伝子の 26 番目のエクソンにおける変異 (C3435T) は、小腸における P-gp の発現レベルと機能に関係する。この変異をホモ接合体としてもつヒトでは、ジゴキシン (digoxin) の単回経口投与で血中濃度が 4 倍高く、 C_{max} もジゴキシンの長期投与で高かった。この変異のホモ接合体はドイツ人では約 24% の頻度で見られる。P-gp の基質には、治療範囲の狭い薬であるシクロスポリン (cyclosporin A)、ベラパミル (verapamil)、テルフェナジン (terfenadine)、フェキソフェナジン (fexofenadine) および多くの HIV-1 プロテアーゼ阻害剤が含まれる。したがって、このタイプの遺伝子多型が、そのアレル (対立遺伝子) をもつキャリアーである患者に対して、最適投与量を予測するうえで重要であるかもしれない。なお、現在 NCBI に登録されている *MDR1* 遺伝子の SNP データには、Hoffmeyer らの報告したもの以外の SNP も含まれており、*MDR1* 遺伝子には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-gp (*MDR1*, *ABCB1*)、*MRP1* (*ABCC1*)、*cMOAT* (*MRP2*, *ABCC2*) について家入らのグループ (鳥取大学) によって実施されて、その結果が報告された。表 9-4 に抱合体トランスポーターである GS-X pump をコードする *MRP1* 遺伝子の SNP 解析の結果を示す。

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みられる。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 P-450 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

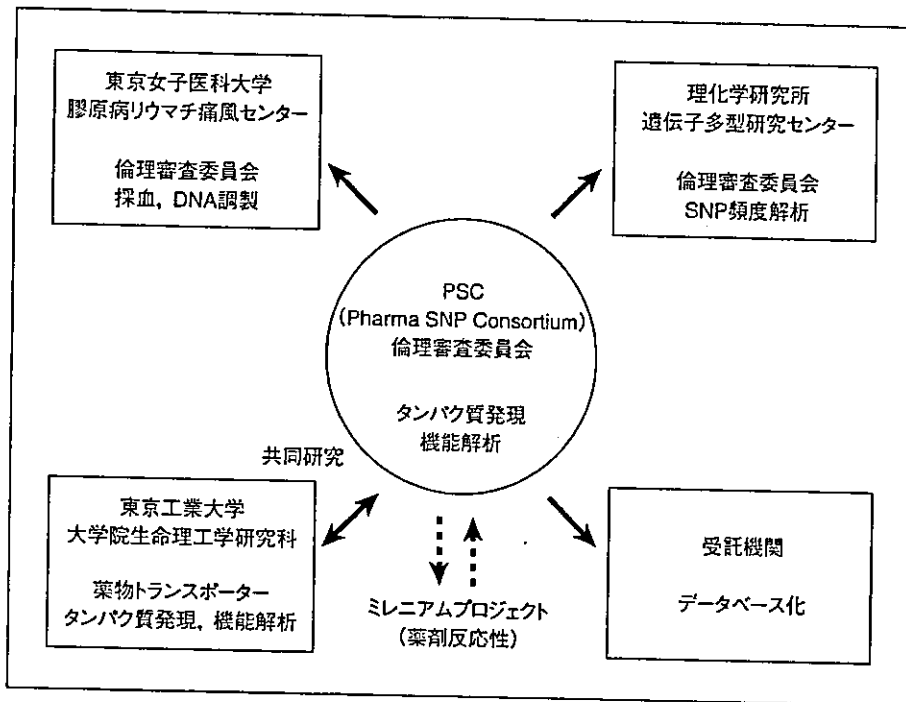


図9-1 ファルマスニップコンソーシアムの研究体制

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 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必要である。

わが国においては、ファルマスニップコンソーシアム（次節参照）との共同研究において、筆者のグループ（東京工業大学生命理工）は、ヒト ABC トランスポーターの一種である ABCG2 (BCRP) の遺伝子多型で、基質特異性が大きく異なることを発見した¹²⁾。一方、中村のグループ（東京大学医科研）は、日本人における ABC トランスポーター遺伝子の SNP マップを報告した¹³⁻¹⁵⁾。他のトランスポーターの遺伝子多型に関して、セロトニン、ドーパミン、GABA（γ-アミノ酪酸）を再吸収するトランスポーターが、臨床での薬剤応答性との関連づけで研究されている。SNP マップと頻度解析に加えて、SNP の

バリデーションをするための機能解析研究が、今後非常に重要になると考えられる。

わが国のファルマスニップコンソーシアム (PSC) の取り組み

遺伝子多型と薬剤応答性との関係は今後の重要な研究課題である。特に、日本人あるいはアジア人特有の遺伝子多型があつて、それらが薬剤応答性に関与する場合、ICH（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）の枠組においては重要な問題になる。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¹⁶⁾。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（図 9-1）。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った。2000年度から2002年度までの3年間、10億円の予算（43社の出資）で研究を実施した。このプロジェクトにおいて、日本人ボランティア約1,000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った。さらに、アミノ酸の変異を導くSNPに関しては、変異型タンパク質を発現させて、その機能解析を行った。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、得られた成果のデータベース化を進めている。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なる。PSCは、わが国初の民間主導型コンソーシアムとして大きな実績をつくり、2003年5月をもって解散する。薬物トランスポーターのSNP機能解析は今後の重要な課題であり、PSCに代わる新たな組織づくりが望まれる。

表現型と遺伝子型のタイピング

現在のところ、薬理遺伝学的試験は、大学病院や臨床開発試験における患者やボランティアに限られているが、将来多くの患者に、その試験は大きなメリットを提供することになるだろう。他方、薬理遺伝学の情報は、投与の際の問題点を内科医に知らせるための薬のデータシートに記述されるようになるだろう。事実、最近の薬理遺伝学に基づく遺伝子タイピングによって、CYP2D6の基質となる向精神薬の投与は、薬理効果の向上、副作用の軽減、医療コストの低下という観点において、大きな改善がみられる。

表現型のタイピング試験においては、特異的マーカーに対する試験薬を投与し、尿、血液、唾液

などのサンプルを採取し、薬およびその代謝分の分析を行わなくてはならない。したがって、表現型のタイピング試験は、時間がかかり、コストが高く、また薬物相互作用やその他の影響も受ける可能性がある¹⁷⁾。それに対して、遺伝子型タイピング試験は、一生のうち1度受ければよく、明白な遺伝情報を提供する。しかしながら、遺伝子型タイピング試験はPMやUMといったグループ分けの情報を提供するものの、薬物代謝活性に関する個人別の情報は提供できない。なぜならば、たとえ同じ遺伝子型でも、そのなかには数多くの個人間の多様性があるからである。

新薬の治験においては、特に遺伝子多型をもつ酵素によって代謝される薬を評価する際、患者やボランティアの遺伝子型のタイピングが非常に有効であるという事実が蓄積してきている。それにより、薬理効果が期待でき、副作用のリスクが低い患者を治験にリクルートすることができ、効率のよい治験が実現できるようになった。

SNP マッピング

トキシコゲノミクス^{*}は、ゲノム研究から派生する新しい技術革新によって様変わりをするであろう。迅速な配列解析と一塩基多型（SNP）の研究は、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。遺伝的にまったく関係のない2人を比較したときに、SNPは300～1,500 bpごとに1個の割合で見つかる。それは、2人の間には約300万個の塩基の違いが存在するということであり、それは、ヒトのハプロイドゲノム（23個の染色体）に30億個ある塩基対の約0.1%に相当する。一般的にSNPの存在する頻度は、母集団の約1%か、またはそれ以上である。いったん、多数のSNPとその頻度が解明されると、それらの情報を患者またはボランティアの遺伝的



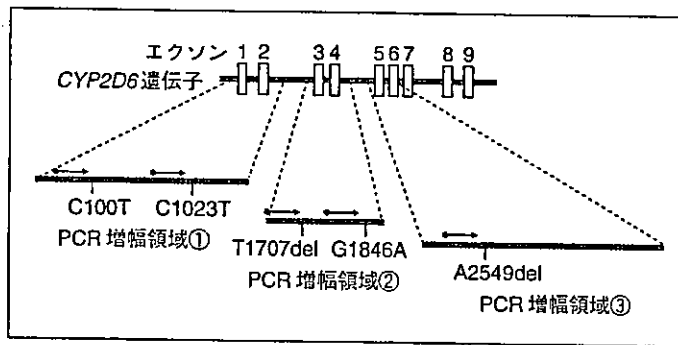


図9-2 CYP2D6 遺伝子の部分的 PCR 増幅法と遺伝子タイピング法 (Sitbon G et al. ファーマコゲノミクス— 21 世紀の創薬と個の医療. p187, 2002¹⁸⁾ より)

「指紋」として応用することができ、個人別の薬剤応答性と結びつけることが可能になる。遺伝子の中でタンパク質をコードしている領域に存在する SNP (cSNP) は、ゲノムあたり約 30,000 から 100,000 個あると推測され、タンパク質のアミノ酸置換や機能の変化をもたらす (すべての cSNP ではない) 可能性がある。遺伝子の中のイントロン部分、または、発現制御領域にある SNP (pSNP; perigenic SNP) はタンパク質の発現量を変化させる可能性をもつ。ヒトゲノム全体にわたる高密度の SNP 地図は、たとえ薬物のターゲットが不明でも、薬剤応答性のマーカーとして SNP を使う際、重要な手がかりとなる。そして「薬剤応答性プロファイル」として、臨床での薬物に対する応答性に関する表現型と結びつけることができるだろう (<http://snp.cshl.org> を参照)。したがって将来、そのような遺伝的要因を考慮することによって、個々の薬効および毒性を予測することは、もはや幻想ではなく現実のものになろうとしている。

MALDI-TOF 質量分析装置を用いた SNP の分析方法

分子生物学/分子遺伝学的手法が確立した今日では、遺伝子変異が簡単に解析できるようにな

った。ヒトゲノム中の複雑な遺伝子変異を分析する方法において、十分な感度と特異性を獲得するために、多くの場合 PCR (polymerase chain reaction) 増幅法を適用している。増幅されたターゲット DNA 断片による SNP を分析するには、種々の方法があるが、そのうちのプライマーエクステンション分析法を、ここでは紹介する。

この方法は DNA ポリメラーゼが塩基に対して、きわめて高い特異性をもつことを利用している。また、プライマーエクステンション分析法は、塩基配列解析に広く使われているジデオキシ停止法を利用している¹⁸⁾。さらに、測定には MALDI-TOF* (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) 質量分析装置を用いる。(株)島津製作所の田中耕一氏は、MALDI の原理を開発したことで、2002 年のノーベル化学賞を受賞した。

例として、CYP2D6 遺伝子の多型をタイピングする方法を示す。1 つのサンプルあたり 3 種類の PCR 反応を行う。第 1 の PCR 反応は、1 番目と 2 番目のエクソンをまたぐ 1,363 bp の領域を増幅するもので、その部分には C100T と C1023T の変異を含む (図 9-2)。第 2 の PCR は、3 番目と 4 番目のエクソンをまたぐ 490 bp の遺伝子領域を増幅するもので、その領域には T1707del と G1846A の変異を含む。第 3 の PCR 反応は、A2549del の変異をもつ 5 番目と 6 番目のエクソンをまたぐ 1,132 bp の領域を増幅する。

PCR 反応で増幅した DNA 断片について、変異箇所の塩基のすぐ 3' 側にアニール (相補的な塩基同士で水素結合) する特異的プライマーをデザイン作成して、2 番目の反応に用いる。また、

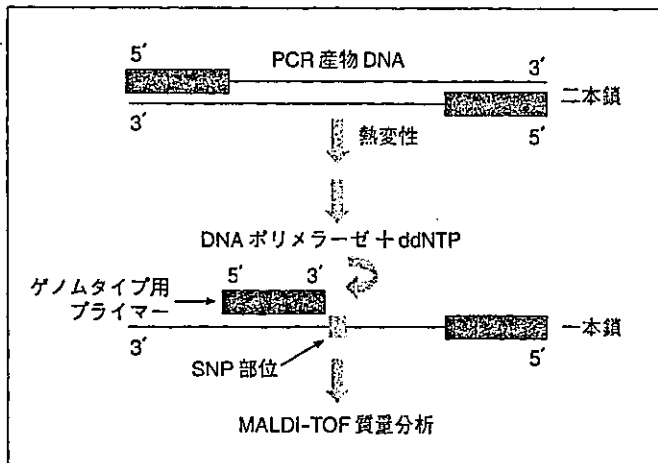


図 9-3 一塩基プライマー延長法*の模式図
 (Ross PL et al. ファーマコゲノミクス—21 世紀の創薬と個の医療. p197, 2002¹⁹⁾ より改変)

変異箇所の塩基に応じて、正常および変異型塩基をもつジデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (ddNTP) を反応混液に加える。その 2 番目の反応中に、プライマーの 3' 末端に 1 分子のジデオキシリボヌクレオチドがつけ加えられるが、それは、変異箇所の塩基の種類によって異なる (図 9-3)。もし変異箇所の DNA 配列が正常であれば、正常の塩基をもつジデオキシリボヌクレオチドがプライマーに結合する。反対に、もし変異箇所に変異塩基が存在した場合には、変異型ヌクレオチドがプライマーに結合する。また、変異をヘテロ接合体*でもつヒトの DNA では、正常および変異型のジデオキシリボヌクレオチドの両方のプライマーに結合する。その理由は、ヘテロ接合体においては、正常と変異型の塩基の両方が変異箇所にあるからである。

こうして 1 分子のジデオキシリボヌクレオチドが結合したプライマーを単離したのち、MALDI-TOF 質量分析装置で測定する。図 9-4 は MALDI-TOF 質量分析装置を用いた結果の例を示す。測定チャートにあるピークは、1 つのヌクレオチドが延長したプライマーと延長していない元のプライマーに対応する。そしてその 2

つのピークの差は、結合したジデオキシリボヌクレオチドの質量に正確に相当する。表 9-5 は 4 種類のヌクレオチド 1 分子の質量を示す。

図 9-5 はサンプル DNA がヘテロ接合体の場合の例を示す。たとえば A/T ヘテロ接合体であれば、2 本のピークの間には 9 Da の差がある。プライマーのサイズが 20 塩基対以下であれば、十分な分解能が得られる。この MALDI-TOF 質量分析装置を用いた方法は、プライマーを蛍

光ラベルや放射ラベルする必要がないので、コスト効率がよくハイスループット化が可能である。将来、このような分析方法は、臨床現場での遺伝子診断に広く用いられるようになるであろう。

トキシコプロテオミクスの新規技術

近年、トキシコゲノミクスの方法論は、創薬の分野において高スピードで発展している。たとえばトキシコゲノミクス用の DNA チップはすでに市販されており、多くの製薬企業がそれに基づいて自社内データベースを充実させている。また必要に応じて、自社製のオリゴ DNA チップを作成して、検査対象の遺伝子群に焦点を絞った解析も行っている。遺伝子発現のプロファイルから、新薬リード化合物が細胞にもたらす毒性を予測する取り組みは、ここ数年の間に急速に進化した。しかしながら毒性予測は遺伝子の発現だけでは把握できない。mRNA とタンパク質の発現レベルは必ずしも一致しないからである。細胞機能は、リン酸化などのタンパク質の修飾とその機能調節によって裏打ちされていることから、プロテオミクスの重要性がでてくる。創薬における毒性予測

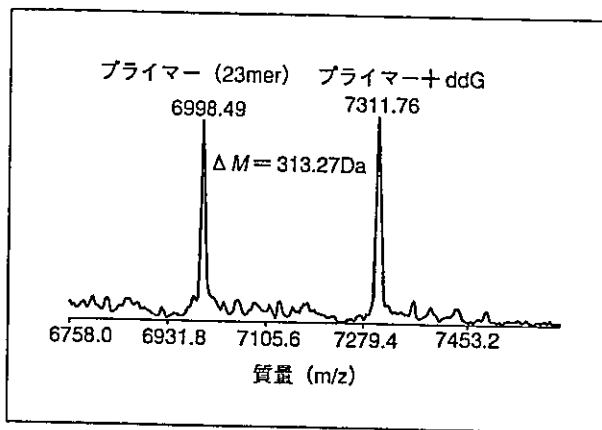


図9-55 ヌクレオチド1分子の質量

ジデオキシリボヌクレオチド (ddN)	質量 (Da)
ddC	273.155
ddT	288.196
ddA	297.210
ddG	313.209

(Ross PL et al. ファーマコゲノミクス— 21 世紀の創薬と個の医療. p197, 2002[®] より改変)

図9-56 一塩基プライマー延長法で得られた MALDI-TOF 質量分析の例

ΔM: 2つのピークの質量差。

(Ross PL et al. ファーマコゲノミクス— 21 世紀の創薬と個の医療. p197, 2002[®] より)

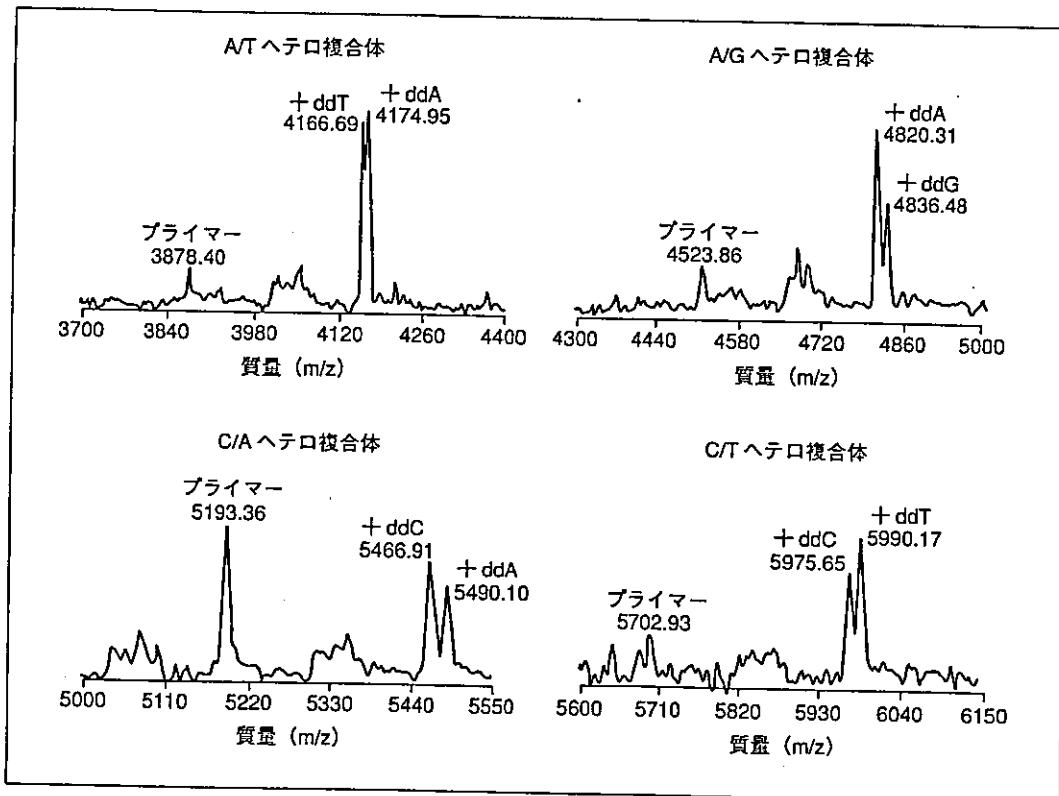


図9-57 ヘテロ接合体の SNP 分析法で得られた MALDI-TOF 質量分析の例

(Ross PL et al. ファーマコゲノミクス— 21 世紀の創薬と個の医療. p197, 2002[®] より)



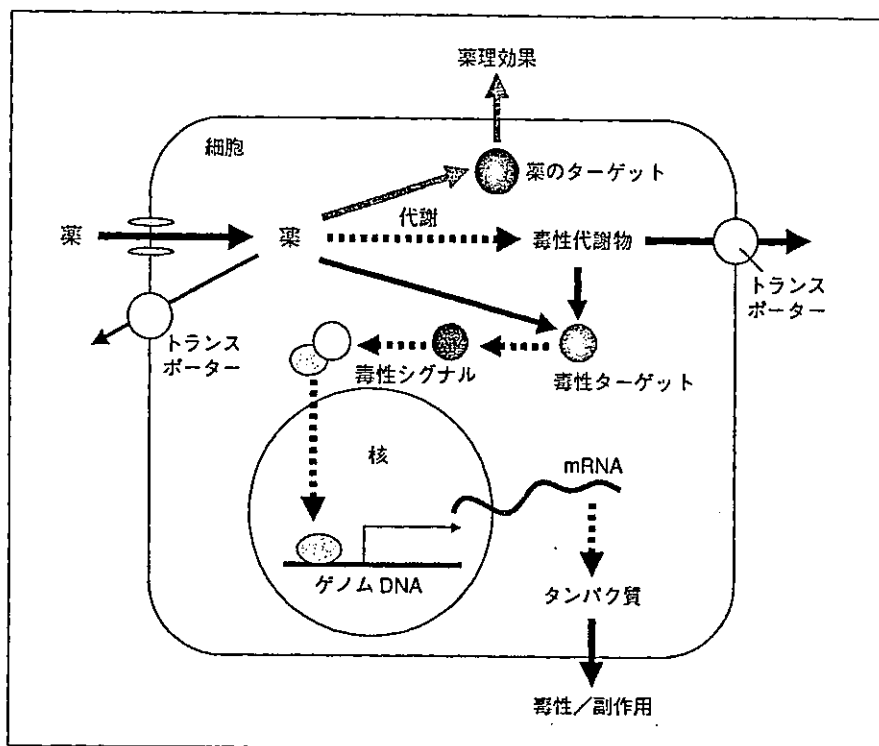


図9-6 トキシコシグナリングの概念図

では、タンパク質が修飾されるプロセスなどが非常に重要になると考えられる。すなわち、トキシコシグナリングという新しい概念と手法が必要である。

わが国の細胞内シグナル伝達の研究は世界をリードしているが、毒性発現のシグナル伝達の解明に関しては、学問的な取り組み方が脆弱である。今後は新規分子プローブを創出する有機合成化学と協調して、細胞内シグナル伝達の知識の活用、広い視野での毒性シグナル経路を把握することが重要である(図9-6)。そして、タンパク質の修飾と遺伝子発現の両方を見るための安価な技術の開発が必要である。しかしながら、DNAチップのように膨大な情報を処理する米国的方法に固執すべきではない。トキシコゲノミクス・トキシコプロテオミクスの究極的ゴールは、あくまでも毒性のターゲットの同定とそのターゲットに親和性をもたない化合物のスクリーニング系の確立、お

よび毒性をもたない創薬分子デザインを実現することである。したがって、わが国発の独自アイデアを国際競争に勝つテクノロジーにインキュベートする必要があり、そのためには国際的な特許戦略も重要なファクターである。以下にトキシコプロテオミクスの新規技術を2つ紹介する。

1. アフィニティービーズを用いた薬物ターゲット分子の探索

東京工業大学の半田宏氏のグループは、新規アフィニティービーズ*を構築して、受容体を細胞粗抽出液から直接、迅速に、しかも回収効率よく単離する技術を開発した。その結果、薬物受容体の同定や、転写因子の単離・同定が容易になり、受容体のライブラリー化や、化学物質と受容体の相互作用および受容体がかかわる生体反応の制御機構の総合的研究が可能になった。この方法を応用することによって、薬物の副作用をもたらす

子ターゲットを同定することも可能である。

従来、相互作用解析にはアフィニティークロマトグラフィーが用いられてきたが、それは、生体分子や化学物質をリガンドとして、粒径 200 μm のアガロースやセファロースなどの多孔性ビーズ担体に固定化して、カラムに詰めて使用した。しかしながら、担体表面への非特異的な吸着や、クロマトグラフィーに長時間を要するという欠点があった。新規開発されたアフィニティービーズは、スチレンを芯にもち、表面を GMA (glycidylmethacrylate) で覆われた粒径 0.2 μm のラテックスビーズである²⁰⁾。このビーズの特徴として、従来の担体より、単位容積あたり数千倍以上の多量のリガンドを固定化でき、適度な強度と比重をもち、分散性、可動性で、しかも物理的・化学的に安定である。さらに、非特異的な吸着がきわめて少ない。このアフィニティービーズを用いて、半田グループは転写因子の精製や、薬剤の受容体の単離に成功している^{21, 22)}。

2. ABC トランスポーターの

ハイスループットスクリーニング系

毒性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うえで非常に重要である。そのため化合物またはその代謝物が薬物トランスポーターの基質になるかどうかを的確に見極める、ハイスループットスクリーニング系の実現が長く待ち望まれていた。筆者のグループ（東工大生命理工）は最近、薬物輸送に関係する ABC (ATP binding cassette) トランスポーター*すべてに応用できる包括的なハイスループットスクリーニング系を開発した²³⁾。それは、ABC トランスポーター cDNA を昆虫細胞に大量に発現させ、その細胞膜画分を用いて基質スクリーニングするものである。昆虫細胞膜を用いる利点として、次のことがらがあげられる：① 昆虫細胞は哺乳類細胞に比較して、増殖速度が速く、細胞維持の

コストも安い、② 細胞膜は保存が容易であり、ABC トランスポーターの発現レベルに関して、品質管理を確実に行うことができる、③ 輸送に関して、細胞膜は凍結したまま行うことができ、融解後すぐ測定に使用できる。

昆虫細胞膜を用いたスクリーニング方法の 1 つは、ABC トランスポーターの ATPase 活性測定である。基質の輸送に伴う ATP の加水分解で生じるリン酸を測定する。しかしながら、細胞膜画分に内在する ATPase 活性によってはシグナル/ノイズ比が不十分な場合がある。その問題を解決するために、さらに新しい方法として、筆者は、細胞膜画分に内在する ATPase 活性によって影響を受けない新規ハイスループットスクリーニング系を開発した（国際特許申請中）。創薬の初期段階、特にコンビナトリアルケミストリーの後、薬物動態に有利なリード化合物を見つけるのに大量の化合物をスクリーニングすることが必要であり、新しく開発された ABC トランスポーターの基質特異性スクリーニング系は、創薬のリード化合物最適化のステップで有効な手段になるものと期待される。

おわりに—今後の展望

薬理遺伝学とファーマコゲノミクスは、薬剤応答性における個人差を研究する分野である。薬剤応答性に関連する遺伝的多様性の知見が迅速に蓄積してきており、2~3 年後には遺伝子タイピングが普及して、薬理効果がより高く、安全な薬剤医療が可能になるであろう。特に、副作用のリスクをもつ患者、または薬理効果が期待できない患者を薬の投与の前にあらかじめ同定することは、医療および創薬に対して、大きなインパクトを与えるであろう。しかしながら、一方では、多くの法律上、規則上の問題や、倫理上の課題も山積みであり、今後解決されなくてはならない。

ゲノム医療に必要な事項	ゲノム創薬に必要な事項
患者リクルートのネットワーク 臨床サンプルの保管と情報管理 臨床検査のスピード化とデータ管理 遺伝子タイピングのハイスループット技術 遺伝子情報と臨床データとのリンク	新薬ターゲット分子の迅速バリデーション リード化合物最適化の効率化・スピード化 薬物動態・毒性ハイスループットスクリーニング技術 ファーマコインフォマティクス ポストマーケット情報の包括的収集と管理

一方、ゲノム研究の成果を現実の医療や創薬に役立てるためのバイオテクノロジー (BT) とインフォマティクステクノロジー (IT) が、世界各地で急激に進化している。わが国においても、ゲノム研究成果を医療や創薬に効率的に応用するための国家的ビジョンを、早急に策定し実効する必要がある (表 9-6)。すなわち、遺伝子多型を高速で解析する低価格のスクリーニング装置の開発や、そのデータを解析して蓄積するコンピュー

タ開発、臨床データと結びつけるためのポータルネットワークなどのインフラを構築する必要がある。ゲノム情報に基づいた医療や創薬研究開発の周辺には、多くの機械製造業、IT 産業、臨床検査企業、バイオベンチャー、試験開発企業などの複合的なバイオテクノロジー関連産業のクラスターが必須である。そして、そこには新しいビジネスチャンスが生まれる可能性がある。

(東京工業大学大学院生命理工学研究科 石川智久)

文献

- 1) Lazarou J, Pomeranz BH & Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: A meta-analysis of prospective studies. *J Am Med Assoc* 279, 1200-5 (1998)
- 2) Silber BM. ファーマコゲノミクス—バイオマーカーと個の医療: 石川智久 (監訳). ファーマコゲノミクス—21 世紀の創薬と個の医療. p9-28 (テクノミック, 東京, 2002)
- 3) Meyer UA. ファーマコゲノミクス—臨床の観点から: 石川智久 (監訳). ファーマコゲノミクス—21 世紀の創薬と個の医療. p129-46 (テクノミック, 東京, 2002)
- 4) Bertilsson L. 薬理遺伝学の現状—薬物代謝: 石川智久 (監訳). ファーマコゲノミクス—21 世紀の創薬と個の医療. p29-44 (テクノミック, 東京, 2002)
- 5) Borst P & Oude ER. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71, 537-92 (2002)
- 6) Nakatomi K, Yoshikawa M, Oka M et al. Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 827-32 (2001)
- 7) 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 (編集). 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. p119-43 (共立出版, 東京, 2002)
- 8) ヒューマンサイエンス振興財団. ゲノム医療・創薬におけるインフォマティクスの動向—バイオインフォマティクス, ケモインフォマティクス, システム生物学. HS レポート No.36, 56-66 (2002)
- 9) Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3473-8 (2000)
- 10) Kerb R, Hoffmeyer S & Brinkmann U. ABC drug transporters: Hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics* 2, 51-64 (2001)
- 11) Ito S, Ieiri I, Tanabe M et al. Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects. *Pharmacogenetics* 11, 175-84 (2001)
- 12) Mitomo H, Kato R, Ito A et al. A functional study on polymorphism of the ATP-binding cassette transporter ABCG2. 投稿中
- 13) Saito S, Iida A, Sekine A et al. Three hundred twenty-six genetic variations in genes encoding nine members of ATP-binding cassette, subfamily B (ABCB/MDR/



- TAP), in the Japanese population. *J Hum Genet* 47, 38-50(2002)
- 14) Saito S, Iida A, Sekine A et al. Identification of 779 genetic variations in eight genes encoding members of the ATP-binding cassette, subfamily C (ABCC/ MRP/CFTR). *J Hum Genet* 47, 147-71(2002)
- 15) Iida A, Saito S, Sekine A et al. Catalog of 605 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among 13 genes encoding human ATP-binding cassette transporters: ABCA4, ABCA7, ABCA8, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, and ABCG8. *J Hum Genet* 47, 285-310(2002)
- 16) 宮城島利一. ファルマニップコンソーシアムが発足：日本人の薬物動態関連遺伝子多型に関する研究. *JPMA News Letter* 79, 1-4(2001)
- 17) 堀井郁夫. 創薬における薬物安全性評価：石川智久, 堀江透(編集). 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. p144-73(共立出版, 東京, 2002)
- 18) Sitbon G & Syvanen A-C. SAGE 一遺伝子発現の網羅的解析：石川智久(監訳). ファーマコゲノミクス— 21世紀の創薬と個の医療. p187-96(テクノミック, 東京, 2002)
- 19) Ross PL, Hall L, Haff L & Garvin A. マルチレックス・ゲノムタイピング—質量分析法：石川智久(監訳). ファーマコゲノミクス— 21世紀の創薬と個の医療. p197-216(テクノミック, 東京, 2002)
- 20) Shimizu N, Sugimoto K, Tang J et al. High-performance affinity beads for identifying drug receptors. *Nature Biotech* 18, 877-81(2000)
- 21) 半田 宏. Affinity beads の構築とその応用. *遺伝子医学* 4, 625-30(2000)
- 22) 長谷川慎, 清水宣明, 宇賀 均, 半田 宏. アフィニティービーズによる薬剤生体レセプターの探索と創薬への応用. *バイオサイエンスとインダストリー* 59, 667-72(2001)
- 23) 藪内 光, 石川智久. ヒトゲノム機能解析から創薬へ：ABC トランスポーターに基づく創薬分子デザイン. *医学のあゆみ* 201, 623-8(2002)

Chapter 3

MDR AND MRP GENE FAMILIES AS CELLULAR DETERMINANT FACTORS FOR RESISTANCE TO CLINICAL ANTICANCER AGENTS

Lei Deng¹, Shigaru Tatebe¹, Yen-Chiu Lin-Lee¹, Toshihisa Ishikawa² and M. Tien Kuo¹

¹*Department of Molecular Pathology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center Houston, Texas, USA*

²*Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan*

1. INTRODUCTION

The constant threat by a countless array of environmental poisons, natural products and synthetic agents, over evolutionary time has led living organisms to develop many elaborate mechanisms that combat the toxic effects of these insults. Among such mechanisms is one that decreases the intracellular accumulation of a toxic substance by directly pumping toxic molecules out of the cells, and another that modifies the metabolism of the toxic substances and effluxes the metabolized compounds. The former mechanism is typified by the mammalian multidrug resistance system mediated by P-glycoproteins (P-gp) that are encoded by the MDR gene family. The second mechanism is exemplified by the multidrug resistance protein (MRP). Both P-gp and MRP contain ATP-binding cassettes and therefore belong to the ABC superfamily of membrane transporters.

Both MDR and MRP systems have been studied extensively over the past several years, and many review articles have been published¹⁻⁴. In this chapter, rather than covering every aspect of both transport systems, we will focus on their clinical relevance. The basic biology of the system that is relevant to their clinical aspects will be briefly discussed. A summary of many important aspects of the MDR and MRP gene families is presented in Table 1.

Table 1. Summary of MDR and MRP gene family.

Family	Gene	Chromosome	Main tissue expression	Substrate	MDR1-like	MDR1-like	MDR1-like	MDR1-like	MDR1-like	MDR1-like	MDR1-like	MDR1-like
MDR	MDR1	7q21.1	Many tissues	?	+	+	+	+	Vincristine, vinblastine, doxorubicin, etc.	MDR1a(-/-) apparently normal		
	MDR2	7q21.1	Liver	Phosphatidyl Choline	-	-	-	-	-	Impaired phospholipid transport		
MRP	MRP1	16p13	Ubiquitous	GSH-conjugates, leukotrienes, steroids, glucuronides, GSSG	+	+	+	+	Etoposide, doxorubicin, etc.	Accumulation of LTC4 in mast cells, impaired in inflammatory response		
	MRP2	10q24	Liver, kidney	GSH-conjugates multispecific organic anions, GSSG	+	+	+	+	Etoposide, MTX, cisplatin	Hyperbilirubinemia		
	MRP3	17q21	Liver, kidney, colon, adrenal gland	GSH-conjugates	+	+	+	+	MTX, etoposide, teniposide	?		
	MRP4	13q31-32	Widely expressed, high in pancreas, kidney, prostate	?	?	?	?	?	?	?		
	MRP5	3q27	Many tissues, high in prostate, lung, muscle, pancreas, testes	?	+	+	+	+	?	?		
	MRP6	16p13	Liver, kidney	?	+	+	+	+	?	?		

2. MDR

2.1 Biology of the MDR System

Juliano and Ling⁵ discovered that a 170-kDa protein was overproduced in MDR cells. They called it P-glycoprotein (P-gp) for permeability glycoprotein, though later it was shown that the permeability of these MDR cells was not altered. P-gp is a membrane protein that acts as an energy-dependent efflux pump. In humans, two classes of MDR genes encode P-gp. MDR1 is involved in multidrug resistance and MDR2 transports phosphatidylcholine into bile. In rodents, *mdr1a* and *mdr1b* (also known as *mdr3* and *mdr1*, respectively) confer drug resistance, whereas *mdr2* is homologous to the human MDR2.

Knockout analysis demonstrated that animals carrying either *mdr1a*(-/-) or *mdr1a*(-/-) *mdr1b*(-/-) backgrounds are apparently normal⁶. When antitumor agents of known P-gp substrates were injected into these animals, accumulation of these agents in certain organs was evident, especially in the blood-brain barrier where P-gp is normally over-expressed⁷. These findings suggested that the primary function of P-gp is to protect against toxic xenobiotics by limiting the uptake of the toxic compounds. These findings also suggest that P-gp may have important implication in clinical drug resistance. Thus, the regulation of P-gp expression levels in tumor cells seems to be an important parameter associated with multidrug resistance.

2.2 Regulation of MDR Gene Expression and P-glycoprotein Activity

MDR1 gene expression and function can be regulated by at least four layers of mechanisms: [i] In chronic selection of drug-resistant cell lines, P-gp may be overproduced through the amplification of *MDR1* genes, thereby increasing its copy number in cells⁸. However, amplification of *MDR1* is uncommon in clinical tumor samples. [ii] Stabilization of *MDR* mRNA represents the second mechanism by which P-gp could be up-regulated⁹. The stability of *MDR1* mRNA seems to be controlled by the presence of AU-rich sequences located at the 3' untranslated region, which occur in many mRNAs with short half-lives¹⁰. [iii] Post-translational modifications such as N-glycosylation and phosphorylation of P-gp may affect its affinity for certain drugs and change the velocity of drug transport^{11,12}. Alternatively, glycosylation and phosphorylation may also affect the stability of P-gp. (iv) Perhaps the most important regulatory mechanism of *MDR1* gene expression occurs at the transcriptional level. The *MDR1* gene appears to be

regulated by an upstream and downstream promoter¹³. Studies with the human *MDR1* promoter have mainly focused on the downstream promoter. Several cis-acting elements controlling basal and inducible expression of *MDR1* by various extracellular influences have been identified¹⁴. Of particular interest is the Y-box that controls basal expression. In 27 out of 27 untreated primary breast cancer samples, YB-1 protein, the transcription factor recognizing the Y-box, was found in the cytoplasm. However, in a subset of tumors in which P-gp expression was elevated, YB-1 was predominantly localized in the nucleus. These results suggest that translocation of the transcription activator YB-1 from the cytoplasmic compartment into the nuclear compartment is correlated to the increased P-gp¹⁵. The underlying mechanisms associated with transcription factor translocation are not yet determined.

2.3 Clinical Relevance of MDR1 in Cancer Chemotherapy

The role of MDR1 expression in conferring drug resistance has been conclusively demonstrated in cultured cell systems. However, its clinical relevance in cancer chemotherapy has not yet been as conclusive. Correlation between levels of *MDR1* gene expression in tumors and treatment outcome for patients has often been used as a first criterion to assess the clinical relevance. Yet, multiple layers of complexity are associated with this general approach. First, a reliably qualitative and quantitative method has to be employed. The probes used should detect MDR1 without cross-reaction with MDR2, which confers no resistance to antitumor agents. As most detection methods have strengths and weaknesses in their own right, it is advisable to use combined detection methods so that the results can be cross referenced. Second, sequential samples prior to and after chemotherapy have to be used. This approach would establish correlation between P-gp expression with response rates of chemotherapy. Unfortunately, many published studies in the literature relied on static, single point in time analyses. To substantiate the role of MDR1 in clinical drug resistance, it is also necessary to determine whether modulation of MDR1 expression would alter drug sensitivity in clinical trials using MDR1 reversal agents.

2.3.1 Significance of MDR1 expression in hematological neoplasms

There is a significant association of MDR1 expression with poor outcome of chemotherapy in the treatment of acute myeloblastic leukemia (AML), multiple myeloma (MM), and non-Hodgkin's lymphoma. Many studies have documented a positive correlation between MDR1 expression and either decreased remission rates or refractory disease in AML^{16,17}. P-gp-mediated drug resistance may be particularly important in the mediation of chemotherapy responses in older patients with AML, a subpopulation that traditionally responds poorly to chemotherapy. An analysis of 211 patients

with AML aged older than 55 years showed that both MDR1 protein expression and altered drug efflux frequently occurred in leukemia cells¹⁸. In several publications, the MDR phenotype is also linked with an increase in early deaths during treatment¹⁹. The MDR phenotype is more frequently seen in CD34⁺ leukemias, and co-expression of P-gp and CD34 identifies a subgroup with very poor prognosis^{20,21}.

In acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients, the incidence of MDR1 over-expression is relatively low compared with that of AML, with a conservative estimate of 10-15% at diagnosis and 34% at relapse²². Although the MDR phenotype is not common among ALL patients, it occurs in certain poor prognostic subgroups of ALL, including adult ALL²³. The majority of studies have concluded that MDR1 expression is not predictive of treatment failure. However, a recent study with 102 newly diagnosed childhood ALL cases found that P-gp expression is an independent prognostic parameter of dismal outcome²⁴.

Although several MDR mechanisms exist in MM, a correlation of MDR1 over-expression and failure of chemotherapy has been observed in most studies with MM^{25,26}. The incidence of P-gp over-expression usually is low at diagnosis in MM, but increases with preceding anthracycline-vinca alkaloid treatment. After eight cycles of VAD (vincristine/adriamycin/dexamethasone) treatment, 85% of MM patients became P-gp positive and 96% of VAD-refractory patients expressed the MDR phenotype^{19,27}. For this reason, MM is regarded as a model of the drug-induced MDR phenotype and is widely used to test the effects of P-gp reversal agents.

2.3.2 Significance of MDR1 expression in solid tumors

It is a challenge to determine the correlation of P-gp expression with outcome of treatment in solid tumors, as solid tumors usually contain heterogeneous cell populations. Moreover, accurate assessment of drug accumulation in solid tumor cells is more difficult than in hematological cells. In organs that normally express high levels of MDR1 proteins such as liver, colon, kidney and adrenal glands, tumors developed in these organs are usually resistant and have a poor response to chemotherapy²⁸. In other tumors, such as breast cancer, ovarian cancer and sarcomas, which derive from tissues that normally do not express a significant amount of MDR1, the initial levels of P-gp are usually low and the primary tumors are responsive to chemotherapy. However, an unacceptable portion of patients eventually experience disease recurrence as the tumor cells become highly resistant. In this group of cancers, multidrug resistance is often an adverse prognostic indicator^{28,29}. A disease-oriented review of the correlation of MDR1 expression and clinical drug resistance in several major solid tumors is presented below.

In lung cancer, the most common malignancy in North America, most patients initially respond to chemotherapy but ultimately relapse and have a poor response to salvage regimens. Yokoyama *et al.*³⁰ immunohistochemically examined P-gp expression in 159 non-small cell lung cancers and found a significant association of poor prognosis and P-gp expression. An earlier study³¹ of sequential samples of 31 small-cell lung cancer patients also reached a similar conclusion. In contrast, the result of a Japanese study of 87 lung cancer patients suggested that MDR1 gene is not associated with tumor progression and drug resistance³². Most patients with metastatic non-small cell lung cancer do not respond to a regimen containing etoposide and cisplatin, which are not P-gp substrates. This suggests the existence of alternative drug resistance mechanisms. Consistent with this is the finding that MRP is generally involved in drug resistance in lung cancers³³.

As in lung cancer, the clinical significance of MDR1 expression in breast cancer is also a topic of great controversy. Studies with samples from 127 primary and 8 locally relapsed breast cancer patients³⁴ and a meta-analysis²⁹ agreed that MDR1 expression in breast cancer is associated with a poor response to chemotherapy. Based on immunochemical analysis with three monoclonal antibodies and RNase protection analysis of 92 primary and 12 metastatic breast cancers, Linn *et al.*³⁵ also concluded that P-gp expression in tumor cells has prognostic value in primary breast cancer and is likely to be a marker of a more malignant phenotype. Similarly, Gregorczyk *et al.*³⁶ also found that P-gp is frequently expressed in patients with untreated breast cancer, with P-gp positive patients being at significantly greater risk of disease recurrence. However, a well controlled study by Lizard-Nacol *et al.*³⁷ with sequential tumor samples from 75 patients could not establish an association between MDR1 expression and clinical outcomes. The report of Hegewisch-Becker *et al.*³⁸ suggests that the contamination of lymphocytes, which express P-gp, can be a potential problem with those studies using RT-PCR as their principle approach to measure MDR1 expression.

Studies of hepatocellular carcinoma generally agree that the chemotherapy response is inversely related to P-gp expression³⁹. Childhood solid tumors, including sarcoma and neuroblastoma, have provided the best evidence for a strong correlation of the expression of P-gp with chemotherapeutic outcome⁴⁰.

2.3.3 Clinical trials using P-glycoprotein reversal agents

Since over-expression of P-gp was identified as a drug resistance mechanism, a variety of compounds have been investigated for their ability to reverse the P-gp-mediated MDR phenotype. These compounds are mostly substrates of P-gp, thereby competing with the available P-gp in transporting antitumor agents.

The first generation of MDR reversal agents, such as verapamil, quinine and cyclosporines, have been shown to greatly increase the sensitivity of resistant leukemia cells to cytotoxic agents both *in vitro* and *in vivo*. However,

serious cardiac effects or immunosuppressive actions limit the utility of these MDR modulators⁴¹.

The second generation of MDR-reversing agents, exemplified by R-verapamil and PSC-833 (also known as valsopodar, a cyclosporin analogue), are much more potent MDR inhibitors, but have less side-effects than their parental compounds. Early studies using R-verapamil in Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma patients showed remarkable improvement in response to chemotherapy^{42,43}. *In vitro* experiments indicated that PSC-833 interacts directly with P-gp with high affinity and probably interferes with the ATPase activity of P-gp⁴⁴. Phase I/II trials with PSC-833 showed that it could be safely administered in combination with different chemotherapy regimens after dose adjustments of cytotoxic drugs that are P-gp substrates⁴⁴. PSC-833 has been intensively tested in patients with AML, MM, and non-Hodgkin's lymphoma, and the results are quite promising. In 1999 alone, there were about 30 reports dealing with the clinical testing results of PSC-833, with most of them focused on the effect of this compound on hematological neoplasms. In a multicenter study⁴⁵, 37 patients with poor-risk types of AML were treated with PSC-833 plus mitoxantrone, etoposide, and cytarabine (PSC-MEC). Overall, post-chemotherapy marrow hypoplasia was achieved in 33 patients. Of these, 12 patients (32%) achieved complete remission and 4 achieved partial remission. The results from a Southwest Oncology Group Trial in patients with poor-prognostic acute leukemia are also encouraging. In this trial, 226 patients were randomized to receive chemotherapy with or without the P-gp antagonist cyclosporin A⁴⁶. In patients treated with cyclosporin A, the relapse-free survival at 3 years demonstrated a significant improvement (43% versus 10%, $P=0.033$). However, definitive clinical benefits of using MDR modulators in hematological malignancies still awaits the results of ongoing randomized Phase III trials.

In solid tumors, the clinical trial results have been largely disappointing⁴⁷. MDR modulators could reverse the MDR phenotype in cultured multicellular tumor spheroids⁴⁸; but the results of clinical tests in renal cancer, colorectal cancer and breast cancer patients have been mostly negative^{47,49,50}. Among solid tumors, perhaps the most promising data are for ovarian cancer. Two studies involving patients with refractory ovarian cancer have shown some benefits of PSC-833^{51,52}.

There is an appealing opinion that a strategy aimed at preventing the emergence of drug resistance is more likely to be successful than MDR reversal interventions. Consistent with this concept are reports by several research groups^{53,54} that the addition of P-gp antagonists in the initial treatment of cancer showed an advantage in preventing the MDR phenotype.

In addition to its role in cancer chemotherapy, the expression of MDR1 may have prognostic value: [i] Baldini *et al.*⁵⁵ reported that increased levels of P-gp in osteosarcoma were significantly associated with the decreased

probability of patients' remaining event-free after diagnosis. These investigators also reported that patients whose tumors had high levels of P-gp had a 2-fold higher relapse rate than those with P-gp-negative tumors. In other studies, it has been reported that the incidence of P-gp over-expression was higher among patients with localized disease at clinical onset than in patients with evidence of metastases^{56,57}. [ii] Elevated P-gp expression has been correlated with a subpopulation of colorectal cancer patients who developed vessel invasion and lymph node metastases⁵⁸. [iii] In primary breast cancer, elevated expression of P-gp has been associated with shorter survival of patients with locally advanced breast cancer⁵⁹. [iv] From a study to determine whether P-gp over-expression has a cause-effect relationship with the reduced metastatic potential of tumor cells, Scotlandi *et al.*⁶⁰ reported that *MDR1*-transfected osteosarcoma cells were completely unable to grow as lung metastases in athymic mice, in contrast to the untransfected controls. These results suggested that P-gp over-expression is causally related to the low malignant potential of osteosarcoma cells. [v] According to Takanishi *et al.*⁶¹, P-gp expression was inversely correlated with the proliferative activity of human hepatocellular carcinoma (HCC). These investigators reported that human HCC presenting higher levels of Ki-67 expression had low levels of P-gp expression; whereas in those showing low levels of Ki-67, levels of P-gp expression were high. These observations, if proven, bear important clinical implications. P-gp levels may be a prognostic marker for selecting a subgroup of cancer patients who require more aggressive chemotherapy; also the idea of using P-gp modulators to enhance chemotherapeutic efficacy may have to take into account that down-regulation of P-gp may alter a tumor's aggressive potential. Further investigations in these areas are warranted.

Finally, it is important to note that the clinical MDR phenotype may involve multiple mechanisms that could co-exist in solid tumors. Only by careful determination of the expression of P-gp at various stages of the treatment, and by combined pharmacokinetic analyses of MDR modulators and antitumor drugs, can treatment outcomes be evaluated for the effects of P-gp expression. Nonetheless, the results thus far collected suggest that P-gp expression may play a role in the treatment of certain types of cancers, depending upon tumor types, treatment regimens, and patient population.

3. MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN (MRP)

3.1 The Biology of MRP

Over-expression of MRP1 has been identified by molecular cloning from a non-P-gp MDR phenotype in cultured cells^{3,4}. In addition to *MRP1*, other *MRP* homologues designated *MRP2-6* have been identified by expressed sequence tags or by using low-stringency hybridization screening conditions.