

図1 トランスポーターの薬理ゲノムとがん化学療法の関わり

抗がん剤を排出することにより, 哺乳類細胞の薬剤耐性の獲得に深く関与するばかりでなく, 個体レベルでの薬剤排出による生体防御機構をも担っている. ノックアウトマウスなどの解析より, ABC蛋白質は脳血液関門としての役割, 小腸における異物, 薬物の吸収, 精巣血液関門, 脈絡層での防御機構, 腎臓での排泄に深く関与することが示されている. このことは, がん化学療法における組織でのドラッグデリバリーにABC蛋白質が関与していることを意味する. さらに最近の遺伝子多型の研究より, これらABC蛋白質の遺伝子多型と薬剤の血中濃度との相関が報告されつつある. すなわち, ABC蛋白質の遺伝子多型が個人の薬物感受性を左右する因子であり, 薬効, 副作用に大きな影響をもたらしていると考えられている. 個人におけるこれらABCトランスポーター遺伝子の発現の程度が, 個人の抗がん剤による感受性を規定する因子の一つとなる (図1)⁵¹⁻⁵³⁾.

これまでに約48種類のABC蛋白質が単離, 同定されている. ゲノム計画の推進により, 各臓器での発現も明らかになりつつある. ABCトランスポーター遺伝子のうち種々の抗がん剤の排出に関与していると考えられているのは, ABCB1(糖蛋白質), ABCC1(MRP1), ABCC2(MRP2, cMOAT)とABCG2(BCRP, MXR, ABCP)である (表1). このファミリーのメンバーはいずれもがATP結合領域(ATP結合カセット ATP-binding cassette, nucleotide

表 1 ABC スーパーファミリー遺伝子の発現

	ABCB1	ABCC1	ABCC2	ABCC3	ABCG2	ABCB11
遺伝子	<i>MDR1</i>	<i>MRP/MRP1</i>	<i>cMOAT/MRP2</i>	<i>MRP3</i>	<i>BCRP/MXR1/ABC P</i>	<i>BSEP/sPGP</i>
蛋白質	P 糖蛋白	MDR 関連蛋白質	胆管有機アニオントランスポーター	MDR 関連蛋白質	乳癌関連蛋白質	P 糖蛋白
	1280アミノ酸	1531アミノ酸	1545アミノ酸	1527アミノ酸	655アミノ酸	1321アミノ酸
染色体	7q21	16p13.1	10q24	17q11-12	4q22	2q24
正常組織の発現	副腎, 腎, 大腸, 肝(毛細胆管側膜), 脳(血管内皮), 胎盤, 子宮(妊娠時)	肺, 精巣, 単核球, 肝(類洞側膜)	肝(毛細胆管側膜) 腎	肝(類洞側膜), 小腸, 前立腺, 膵臓	胎盤, 脳, 前立腺, 小腸, 精巣, 卵巣	肝(毛細胆管側膜)

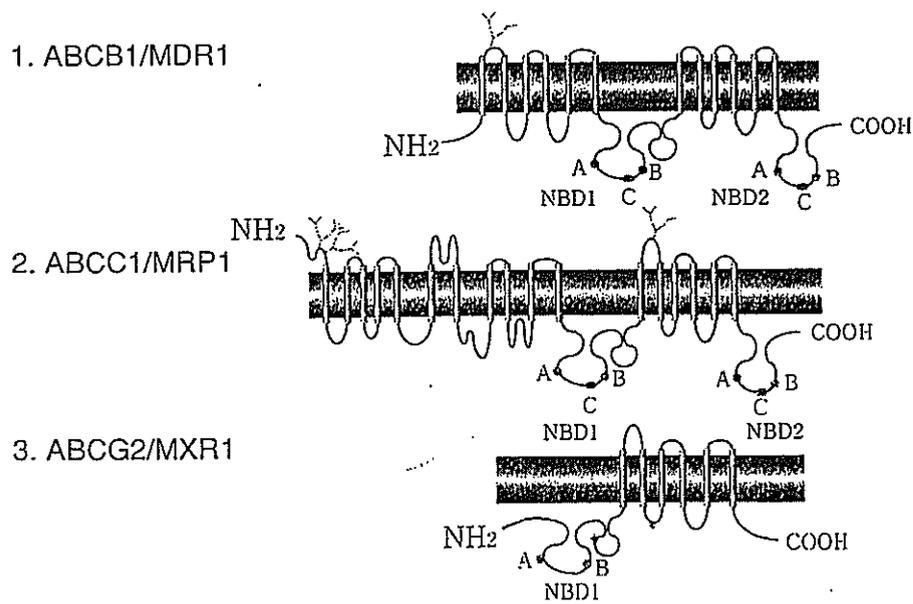


図 2 トランスポーターの構造モデル

binding fold ; NBF) ドメインをもつことから, ABC トランスポーター・スーパーファミリーと呼ばれ, いずれも ATP のエネルギーに依存して様々な物質を膜の内外へ能動輸送すると考えられている. その構造は, ヒトでは, 数回膜を貫通する疎水性のドメインと ATP 結合領域を含む細胞質ドメインが 2 回繰り返される形になっている場合と, N 末端と C 末端の半分ずつが独立したポリペプチドにより構成される場合とがある (図 2)^{99, 100}.

1.2 抗がん剤感受性に関わる ABC 蛋白質

ABCB1/MDR1 (P 糖蛋白質) MDR1/P 糖蛋白質 (multidrug resistance 1/P-glycoprotein)

ABCB1 遺伝子は第 7 染色体 7q21.1 に存在し, 1,280 のアミノ酸残基からなる。1986 年に抗がん剤多剤耐性細胞から初めて単離された¹¹⁾。*MDR1* 遺伝子はバクテリアからヒトまでよく保存され, その構造は 6 回の膜貫通ドメインと ATP 結合領域を含む 1 つの細胞質ドメインが各 2 回繰り返される構造をしている (図 2)。ヒトでは 2 種, マウスでは 3 種の MDR ファミリー遺伝子が単離されており, 培養細胞での強制発現実験から, 耐性獲得に関与するのはこのうちヒト *MDR1*, マウス *mdr1a* および *mdr1b* 遺伝子であることが明らかにされている。P 糖蛋白質は種々の抗がん剤をはじめとする疎水性薬物を排出するポンプである。培養細胞から樹立した薬剤耐性株の耐性薬剤スペクトラムおよび cDNA を用いた強制発現実験から得られた, MDR1/P 糖蛋白質の関与する抗がん剤を表 2 にまとめた¹²⁾。

正常組織においても P 糖蛋白質は発現し, 細胞内の異物, 薬物変化体の排出に関与して組織, 生体の防御機構に深く関わっている。特に, 脳血液関門における機能バリアーとして働き, 脳内への薬物の侵入を阻害し, 脳の防御基点と考えられている¹³⁾。実際, *mdr1a*, *mdr1b* ノックアウトマウスは長期間生存し, 野生型マウスと著明に異なる表現型は観察されなかった。しかし, ノックアウトマウスでは異物に対する感受性が増し, 特に脳への影響が大きく, MDR1/P 糖蛋白質が血液脳関門で異物排泄に働いていることが示唆される。また, P 糖蛋白質は妊娠時の子宮胎盤, 腎臓, 小腸, 副腎, 肝臓の apical 側に発現しており, 生理基質であるステロイドや毒性物質を管空側に排出していると考えられている。血液幹細胞にも P 糖蛋白質は発現しており, 血液幹細胞の防護にも深く関わることを示唆される¹⁴⁾。

ABCC1/MRP1 (multidrug resistance-associated protein)

ABCC1 は第 16 染色体 16p13.1 に位置し, Cole らによりアドリアマイシン耐性肺小細胞がん細胞株から 1992 年に単離された¹⁵⁾。MRP1 も種々の耐性腫瘍細胞に発現しており, グルタチオン抱合を受けた薬物, 異物を排出するポンプである。アミノ酸配列やその Kyte-Doolittle 疎水性分析の結果から, P 糖蛋白質

表2 ABCスーパーファミリー遺伝子と抗がん剤

シンボル	ABCBI	ABCC1	ABCC2	ABCC3	ABCG2	ABCB11
遺伝子	<i>MDR1</i>	<i>MRP/MRP1</i>	<i>cMOAT/MRP2</i>	<i>MRP3</i>	<i>BCRP/MXR1/ABCP</i>	<i>BSEP/sPGP</i>
抗がん剤	アンストラサイクリン ドキソルビシン ダウノルビシン ビンカアルカロイド ビンクリスチン ビンブラスチン CPT-11 SN-38	アンストラサイクリン ドキソルビシン ダウノルビシン ビンカアルカロイド ビンクリスチン ビンブラスチン エトポシド テニポシド メトトレキセート	ビンカアルカロイド ビンクリスチン ビンブラスチン カンプトテシン誘導体 CPT-11 SN-38 シスプラチン	エピドファイロキシン エトポシド テニポシド メトトレキセート アンストラサイクリン ドキソルビシン	アンストラサイクリン ドキソルビシン ダウノルビシン マイトキサントロン カンプトテシン誘導体 CPT-11 SN-38	抗微小管剤 タキソール
生理基質	中性、陽イオン化合物	グルタチオン抱合体 グルクロン酸抱合体 グルタチオン	有機アニオン グルタチオン抱合体 グルクロン酸抱合体 グルタチオン	グルクロン酸抱合体 硫酸抱合体	有機アニオン ステロイド	胆汁酸

質と相似性を示す ABC トランスポーター膜貫通蛋白質であることが明らかにされた。MRP は N 末端側半分は 11 回，C 末端側半分は 6 回の合計 17 回の膜貫通ドメインをもつ構造モデルが提唱されている (図 2)¹⁶⁾。

P 糖蛋白質と MRP1 蛋白質の基質の多くはオーバーラップしているが，MRP1 は特にグルタチオン抱合を受けた薬物を主に排出する。MRP は P 糖蛋白質とわずか 17% の相同性しかもたないにもかかわらず，両者はアンスラサイクリン，ビンカアルカロイド，エピポドフィロトキシンを含む共通した薬剤に対して耐性を付与する。しかし，MRP の過剰発現株は P 糖蛋白質の場合と異なり，コルヒチン，タキソールには耐性を示さず，ヒ素またはアンチモンを含む酸化アニオンに耐性を示す (表 2)。MRP1 はさまざまなグルタチオン抱合体を排出し，抗がん剤もグルタチオン抱合体として，またはグルタチオンと共輸送の形で細胞外に輸送するとされている。

Borst らは，MRP のノックアウトマウス *mrp^{-/-}* が，ロイコトリエン C₄ の排出低下のみならず，抗がん剤エトポシドやビンクリスチンに対する毒性が減弱していることを観察し^{17,18)}，*in vivo* での MRP の抗がん剤排出を示唆している。MRP1 は生理基質として炎症メディエーターであるロイコトリエン C₄ を含むグルタチオン抱合体を輸送し，化学物質，酸化ストレスに対する生体防御の役割に深く関わっていると推察されている。気管支上皮細胞などの上皮および心臓，sarcolemma vesicle で行われるグルタチオン抱合体の輸送，マクロファージでアナフィラキシーや喘息に関係するロイコトリエン C₄ の輸送に関与している可能性がある。実際，野生型マウスの耳をアラキドン酸で処理すると炎症の指標である血管透過性が増して浮腫を起こすが，MRP1 ノックアウトマウスではこの反応が起こらない。また内分泌機能をもった細胞，副腎皮質，胎盤トロホプラスト，精巣のテストステロン産生細胞に MRP が発現していることと，*in vitro* でステロイド (17β-エストラジオール) のグルクロン酸抱合体を輸送することとを考え合わせると，ホルモン輸送に関与している可能性もある¹⁹⁾。

ABCC2/MRP2/cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter)

ABCC2 は第 10 染色体 10q24 に位置し，主に肝臓の毛細胆管側に発現している。この MRP2/cMOAT は，MRP1 と 47%，CFTR と 3%，また MDR1 と 18% の相同性を示すが，疎水性分析の結果から，MRP の構造との相同性が高

い (図 2)^{201, 211}. *MRP2/cMOAT* 遺伝子のアンチセンス cDNA を HepG2 細胞へ導入発現させると, シスプラチンを含む複数の抗がん剤に対する感受性を増加させることができるから, ヒト *cMOAT* が細胞のシスプラチン輸送体として機能している可能性が示唆された²¹¹. *MRP2/cMOAT* の関与する抗がん剤については表 2 に示した. *MRP2* が過剰発現した細胞では抗がん剤に対して耐性を示すようにはなるが, 臨床上的での *MRP2* の重要性はまだはっきりとはしていない. 大腸がん細胞, 肺がん細胞で *MRP2* の発現亢進が報告されている.

MRP2 は肝細胞からビリルビンをはじめとする有機アニオン化合物を胆汁中に排出する. *MRP2* の欠失したラットで黄疸を示し, 有機アニオン化合物の排出活性が低下する. 一方, ヒトの Dubin-Johnson 症候群の患者では, 有機アニオンの 1 つであるグルクロン酸抱合型ビリルビンの肝細胞から胆管への輸送に欠損があることが以前より指摘されていたが, 実際にこの疾患の患者の *cMOAT* 遺伝子に変異のあることが見いだされ, 原因遺伝子であることが示された. そして, *MRP2/cMOAT* は肝臓においてビリルビンなどの有機アニオンの排泄を行っていることが明らかにされた²³¹.

ABCC3/MRP3

ヒトゲノムプロジェクト研究で進められている EST データベースから, *MRP* や *cMOAT* 以外に数種類の *MRP* ファミリー蛋白質が存在することが示唆され, 筆者らは新規 *MRP* ファミリー遺伝子 *MRP3* のクローニングに成功した. *MRP3* は *cMOAT* や *MRP1* に高い相同性を示し, さらに疎水性解析の結果も近縁 ABC トランスポーターであることを示している (表 1)^{241, 251}. *MRP3* は染色体上 17q11-12 に位置し, 強制発現細胞株を用いた系によりマイトキサントロンを基質とすることが示唆された. 臨床上的での *MRP3* の重要性はまだはっきりとはしていない.

ABCG2 MXR/BCRP/ABCP

第 4 染色体 4q22 に位置する *ABCG2* 産物はアミノ酸 655 の ATP 結合領域を 1 つだけでも *half-transporter* であり, BCRP (breast cancer resistance protein), MXR (mitoxantrone resistance gene) と名づけられた²⁶¹. mitoxantrone に対して耐性を示す細胞株に *ABCG2* の過剰発現が観察された結果, 見つ

かった遺伝子である。トランスフェクションの実験より、マイトキサントロン、ドキソルビシン、ダウノルビシンに耐性を示した。この half transporter はホモダイマーとして働くと考えられている。血液幹細胞において発現亢進が認められ、ローダミンなどの色素を排出することが観察されている、このことは血液幹細胞の異物からの防御に働くことを示していると考えられるが、生理的な基質はわかっていない²⁷⁾。ABCG2 は胎盤において強く発現しており、母胎から胎児への薬物、異物移行の防御的役割、および胎児からの有害物質の排出に関与するものと考えられている。mdr1a, mdr1b, mrp1 トリプルノックアウトマウスでは mitoxantrone 投与により ABCG2 の発現誘導がみられた²⁸⁾。このことから、ABCB1, ABCC1 に並び ABCG2 が抗がん剤耐性の重要な因子であることがうかがえる。ABCG2 の阻害剤も有効な抗がん剤耐性克服剤になる可能性がある。

ABCB11/BSEP

胆汁酸排出ポンプ (BSEP: bile salt export pump) の実体として長らく不明であった遺伝子がラットでクローニングされ、すでに部分的にクローニングされていた sPGP (sister of P-glycoprotein) と同一の遺伝子であることがわかった。sPGP は肝毛細胆管側に発現し、2つの ATP 結合領域をもち、マウス mdr1b に 70% の相同性を示す MDR ファミリーに属する (表 1)。トランスフェクションの実験からは、タキソールにだけ耐性を示し、ビンブラスチンなどの薬剤には耐性を示さない (表 2)²⁹⁾。しかし、タキソールが sPGP の基質となることの証明、また臨床検体における sPGP の発現についての検討はまだ行われておらず、トランスポーターとしての薬剤耐性への関与は明らかではない。BSEP はやはり肝臓で発現している。ラットの BSEP は胆汁酸を輸送できることが *in vitro* の実験で確認された。

ABCB2/MDR3

多剤耐性に関与しない *mdr2* 遺伝子 (ヒト *PGY3/MDR3* のオルソログ) のノックアウトマウスも長期間生存したが、こちらは血清中のビリルビン、アルカリホスファターゼなどの酵素活性が上昇しており、肝機能障害が推測された。実際にこのノックアウトマウスの肝組織を病理学的に検討した結果、胆管細胞の

増殖や炎症が観察された。 *mdr2* 遺伝子は肝の毛細胆管細胞の膜に発現しており、胆汁中への未知物質の分泌に関与している可能性が示唆された。胆汁成分を分析した結果、 *mdr2* ノックアウトマウスではリン脂質の分泌が顕著に減少していることが明らかになった³⁰⁾。この結果について、リン脂質不在の胆汁が毛細胆管細胞膜からリン脂質、コレステロールを溶出させ、その結果、肝に障害を与えるのではないかと考えられている。一方、 *mdr2* ノックアウトマウスが示す表現型は、3型の進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (PFIC) の臨床所見に一致している。胆汁は胆汁酸、電解質、脂質より構成され、腸で脂肪の乳濁、蠕動増加および腐敗の防止といった役割を担っている。また、胆汁は肝臓から胆管を經由して十二指腸に放出されるが、この胆汁流 (bile flow) は各成分の能動輸送により生ずると考えられている。この胆汁産生や胆汁流の衰弱した状態が胆汁うっ滞である。3型の患者では *PGY3/MDR3* 遺伝子の mRNA と蛋白質が欠如していること、さらに *PGY3/MDR3* 遺伝子に変異のあることが示されている³¹⁾。

1.3 耐性克服

ABC 蛋白質の阻害剤の研究がなされている。これら ABC 蛋白質の阻害剤は抗がん剤化学療法治療中の多剤耐性を変化させ、抗がん剤を効きやすくさせることが期待されている。特に、P 糖蛋白質の高発現している腫瘍においては P 糖蛋白質阻害剤のベラパミル (verapamil) などが有効であるか否かが、前臨床試験、臨床試験で検証されている。

1.4 *MDR1*, *MRP* 遺伝子群の発現誘導

ABCB1/MDR1 遺伝子の発現誘導

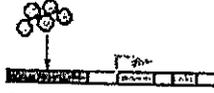
P 糖蛋白質が過剰産生され耐性を獲得するには、*MDR1* 遺伝子の増幅、転写因子の発現亢進、活性化、翻訳レベルの活性化、糖鎖修飾などの翻訳後活性化などのメカニズムが考えられているが、臨床例はなかった。ヒト *MDR1* 遺伝子領域を含む酵母人工染色体 (YAC) をマウス細胞に導入し、外来性ヒト *MDR1* 遺伝子と内在性マウス *mdr1a*, *mdr1b* 遺伝子の発現を解析し、DNA メチル化が発現調節のキーを担っていることが明らかになった。さらに、ヒトがん培養細胞株および AML や膀胱腫瘍の臨床検体を用いて、*MDR1* 遺伝子プロモー

I. 正常組織

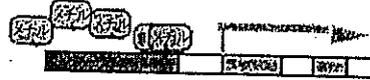


II. がん組織

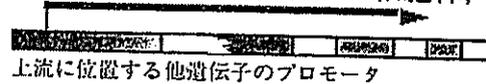
1. 転写因子 YB-1 の核内移行 (骨肉腫, 乳がん)



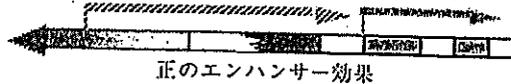
2. 5'-制御領域の脱メチル化 (AML, 膀胱腫瘍)



- 3.1. 遺伝子再編成 (1) (乳がん細胞株, ALL?)



- 3.2. 遺伝子再編成 (2) (マウス白血病 *in vivo* モデル)



4. 遺伝子増幅 (なし)

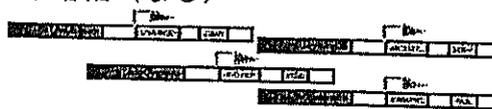


図3 がんにおける *MDR1/P* 糖蛋白質遺伝子の多様な発現制御

ター領域 CpG 部位の脱メチル化が *MDR1/P* 糖蛋白質発現の必須条件となっていることが明らかになった³²⁾。一方, *MDR1* 遺伝子の転写因子として YB-1 が重要であることがわかっていたが, 最近, 乳がんの臨床検体で, YB-1 の核移行が P 糖蛋白質発現と 100% 相関することが示された。MDR1/P 糖蛋白質については, 臨床での耐性の獲得機構がようやく明らかにされつつあり, 今後のさらなる解析と, YB-1 の核移行や *MDR1* 遺伝子の DNA メチル化を阻止することによる新しい治療法開発への展開が期待される (図 3)³³⁾。

MRP2/cMOAT 遺伝子発現の個人差と発現誘導

変異や多型による *MRP2* 蛋白質の機能異常とともに, *MRP2/cMOAT* 遺伝子の発現レベルも重要である。MRP2 蛋白質は, cAMP, デキサメサゾン, リファンピシン, タモキシフェン, シスプラチン, 2-アセチルアミノフルオレン, シクロヘキシミドなどで発現誘導が, またリポ多糖やサイトカインで発現の低下

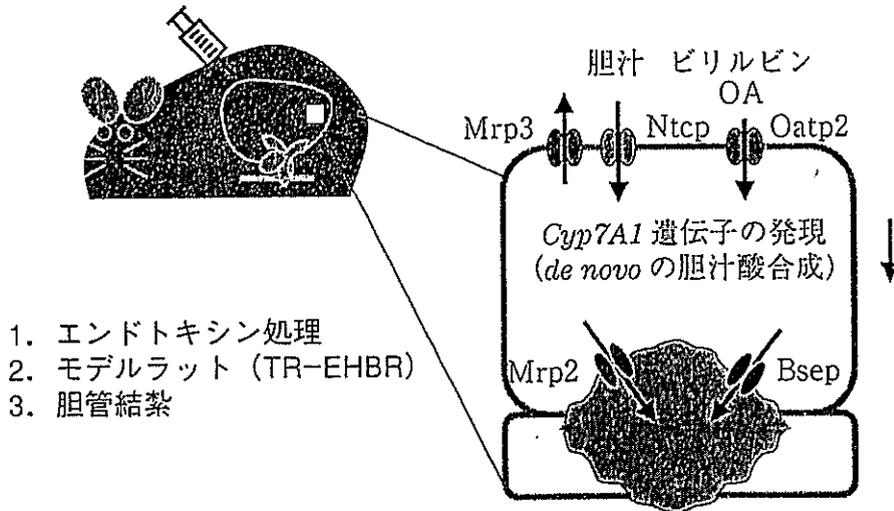
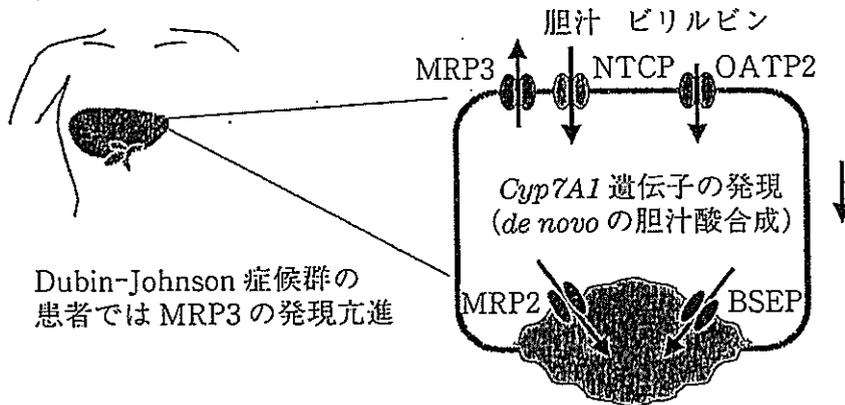


図4 黄疸, 胆汁うっ滞を示す肝病変における ABC トランスポーターの発現変化 (動物モデル)



実験モデル	発現の変化	転写因子
胆汁酸処理	NTCP ↓, Cyp7A1 ↓	FXR, SHP
LPS 処理	NTCP ↓, OATP2 ↓	HNF1 α
C 型肝炎ウイルス接種 炎症惹起サイトカイン	MRP2 ↓	IRF-3

図5 黄疸, 胆汁うっ滞を示す肝病変における ABC トランスポーターの発現変化

が観察されている。一方, 大腸がんや肝がん患者の非がん部について, 免疫染色および RT-PCR により解析した筆者らの結果から, cMOAT 蛋白質や *MRP2/cMOAT* mRNA の発現量には劇的な個人差が存在することがわかってきた。 *MRP2/cMOAT* 遺伝子と同様に ABC トランスポーターファミリーに属する *MDR1* 遺伝子の場合には, プロモーター領域の CpG のメチル化により発現が負に制御されていることが急性骨髄性白血病, 膀胱がん, 大腸がんおよび正常大

腸粘膜を用いた解析から明らかになったことや、*MRP2/cMOAT* 遺伝子のプロモーター領域にも複数の CpG が存在していることから、*MRP2/cMOAT* mRNA の発現量の個人差も CpG メチル化などのエピジェネティックな機構により制御されている可能性がある。発現の多寡とプロモーターなどの遺伝子多型との関連についても今後明らかにされるであろう。さらに、*MRP2/cMOAT* 遺伝子の多型と排出活性、基質特異性や遺伝子発現の異常との相関、薬物への感受性の個人差や体内動態への関与が間もなく明らかにされてゆくであろう。

肝臓と、腸管では多くの ABC トランスポーターが発現しており、薬物や異物の排出に関わっている。これら ABC トランスポーターの発現レベルの変化は薬物に対する感受性の個人差や、体内動態に深く関与している。特に、炎症性疾患や肝障害などにおいて ABC トランスポーター遺伝子発現が著明に変化することが予測される (図 4)。実際に、C 型肝炎感染者症例では、肝臓で 5 つの ABC トランスポーターの中で特異的に *MRP2* の発現レベルが著しく低下していることが観察された³⁰⁾。また、炎症性サイトカイン IL-1 (インターロイキン-1) により *MRP2* プロモーターの活性低下が認められ、ISRE 領域がこの活性に関与することが最近明らかになった。一方、大腸がんや肝がん患者の非がん部について、免疫染色および RT-PCR により解析した結果から、*cMOAT* 蛋白質や *MRP2/cMOAT* mRNA の発現量には劇的な個人差が存在することがわかってきた。(図 5)

代表的 ABC トランスポーターである P 糖蛋白質/MDR 遺伝子ならびに *MRP2* や *MRP3* についても、ヒトがんにおける特異的発現機構の研究が明らかになりつつある。特に、がん治療と診断への関与を進め、薬剤耐性や感受性を制御する分子機構を解明し、この分野の適切な薬剤投与の基盤づくりに寄与できると考えられる。

2. Dubin-Johnson 症候群

肝は多くの代謝産物や異物を、直接あるいは解毒、抱合し排泄するというきわめて重要な機能をもつ。したがって、各トランスポーターの機能異常や発現量の多寡により多くの疾病がもたらされ、また薬物の体内動態が影響を受けることが予測される。このような疾病の病態と発症機構の解析から、各疾病の診

断と治療が可能になると同時に、各トランスポーターの生理機能を知ることができる。ABCトランスポーターファミリーに属する *MRP2/cMOAT* 遺伝子について、この遺伝子が遺伝性の黄疸疾患である Dubin-Johnson 症候群の責任遺伝子であることや、肝臓の胆管側膜に発現する MRP2 蛋白質はグルクロン酸抱合型ビリルビンと他の有機アニオンを輸送するトランスポーターであることが明らかになった。

2.1 Dubin-Johnson 症候群と体質性黄疸

体質性黄疸とは、先天性のビリルビン代謝異常により血中ビリルビンの上昇した状態である。ヒトの血清中ビリルビンの80%は老廃赤血球のヘモグロビンに由来し、正常体内では肝細胞で、有機アニオンの一つであるグルクロン酸などに抱合解毒されたのちに胆管から腸へと排泄される。体質性黄疸では、血中ビリルビンの上昇原因として考えられる機作のうち、溶血、肝細胞障害、胆道閉塞は関与せず、ビリルビンの摂取、抱合、細胞内輸送、排泄のいずれかが障害されていると考えられている(図6)。上昇ビリルビンのタイプにより、間接(非抱合型)高ビリルビン血症を示す Craigler-Najar 症候群 I 型, 同 II 型, Gilbert 病と、直接(抱合型)高ビリルビン血症を示す Dubin-Johnson 症候群, Rotor 症候群に分類される。間接高ビリルビン血症については3症候群いずれもでビリルビン UGT (UDP-glycosyltransferase,) 遺伝子 (*UGT1A1*) の変異が同定されている。直接高ビリルビン血症のうち Rotor 症候群については、責任遺伝子が未だ同定されていない。

Dubin-Johnson 症候群は稀な疾病であるが、ユダヤ系イラン人では 1,300 人

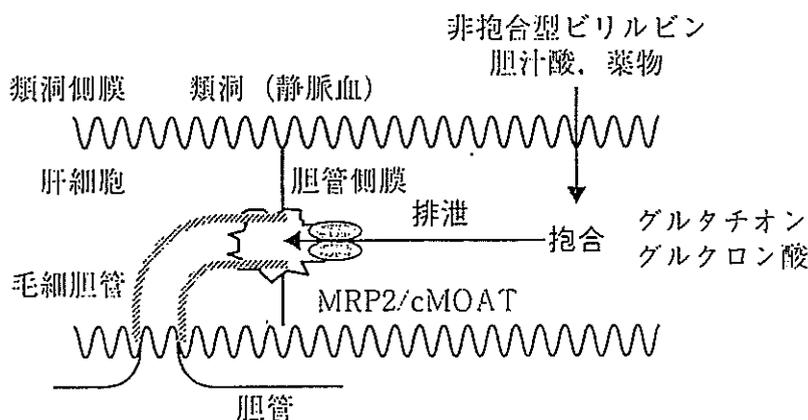


図6 肝臓におけるビリルビンの抱合、排泄経路

に1人と報告されている。日本人における頻度は100万人に1人であり、これから500人に1人がキャリアーであると計算される。遺伝形式は常染色体劣性である。メラニン様またはリポフスチン様顆粒の肝細胞内沈着、黒色肝、BSP (sulfobromophthalein) の軽度停滞および再上昇、尿中のコプロポルフィリンA イソマーI分画の顕著な増加がこの疾病に特徴的な臨床所見である。以上の臨床所見はいずれも、Dubin-Johnson 症候群では直接ビリルビンや他の有機アニオンの胆管への排泄が障害されていることを示している。すなわち、BSP は肝で抱合を受けたあと、この疾病の患者では胆管への排泄が障害されているので、血中へ移行し、このために遅延性に上昇が認められると解釈できる。また、コプロポルフィリンの2つの異性体のうち“Ⅰ”は主に胆汁中に、“Ⅱ”は尿中に排泄されるが、患者では“Ⅰ”の排泄経路が胆汁から尿へと変化するために尿中のアイソマーI分画が上昇すると解釈できる。

2.2 Dubin-Johnson 症候群における *MRP2/cMOAT* 遺伝子変異の同定

① *MRP2/cMOAT* 遺伝子は肝臓の胆管側膜に特異的に発現していること (図7)、② *cMOAT* に近縁の *MRP* (図2) はグルタチオンおよびグルクロン酸抱合体を排出すること、③ ビリルビンはグルクロン酸抱合をうけて肝臓より排出されるが、その排出障害がDubin-Johnson 症候群の原因であると考えられていることより、*MRP2/cMOAT* 遺伝子がDubin-Johnson 症候群の責任遺伝子であると想定され、患者で変異を同定することが試みられた。その結果、6家系7人の患者から4種類の変異が同定され、*MRP2/cMOAT* 遺伝子がDubin-Johnson 症候群の責任遺伝子であることが明らかになった (図7)。現在までに明らかにされたDubin-Johnson 症候群の患者の*MRP2*の変異について図8にまとめた^{29),35),36)}。

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たミスセンス変異で、7人中4人に見られた。この部位はABCファミリー遺伝子の間でよく保存されたATP結合領域のCモチーフ (active transport family signature と呼ばれる) に相当し、機能上重要であることが推察される。4145 (A → G) 変異はC端ATP結合領域の1382番目グルタミンからアルギニンへのミスセンス変異で、同一の変異が嚢胞性繊維症の*CFTR* 遺伝子に見られることから、この変異が*MRP2/cMOAT* の機能を障害していることが予測され

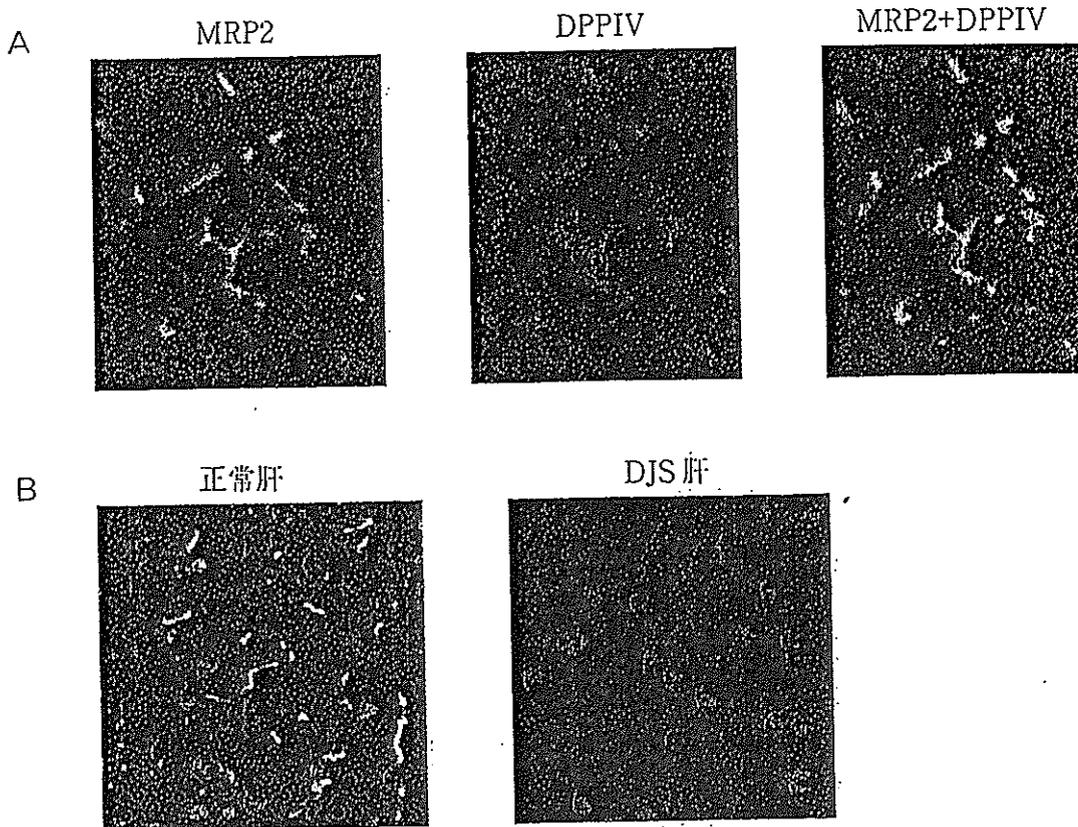


図7 正常肝での MRP2 の発現と Dubin-Johnson 症候群患者での欠損

(A) 正常肝における MRP2/cMOAT 蛋白質の細胞内局在, 抗 MRP2 抗体 (緑色) と胆管側膜のマーカーであるジペプチジル・ペプチダーゼに対する抗体 (DPPIV, 赤色) を用いた, 共焦点レーザー顕微鏡による間接免疫染色像を示す. MRP2+DPPIV は両者の合成像を示し, 緑色と赤色の合成による黄色を呈していることより, 両者の局在が一致することがわかる.

(B) Dubin-Johnson 症候群患者 (DJS) の肝. 左の正常肝に見られる緑色の MRP2 の発現が見られない.

る. 2つのスプライス部位変異 1815+2 (T → A) と 2439+2 (T → C) については, cDNA の解析から, 変異によりそれぞれエクソン 13 と 18 がスキップすることを明らかにされている. さらに家系の解析から, 変異の分離と発症が完全に一致することが示され, *MRP2/cMOAT* 遺伝子が Dubin-Johnson 症候群の責任遺伝子であることを遺伝学的に証明することができた. 興味深いことに, 同定されたすべての変異は ATP 結合領域とその近傍に集中している (図 8). *PGY1/MDR1* の膜貫通ドメインの変異は基質特異性を変化させるが, トランスポート活性そのものは残ること, *CFTR* の場合も変異の 80% は ATP 結合領域に検出されいづれも重篤な症状を呈することなどからも, *MRP2/cMOAT* においても ATP 結合領域が生理機能に必須であり, 膜貫通ドメインは基質特異性

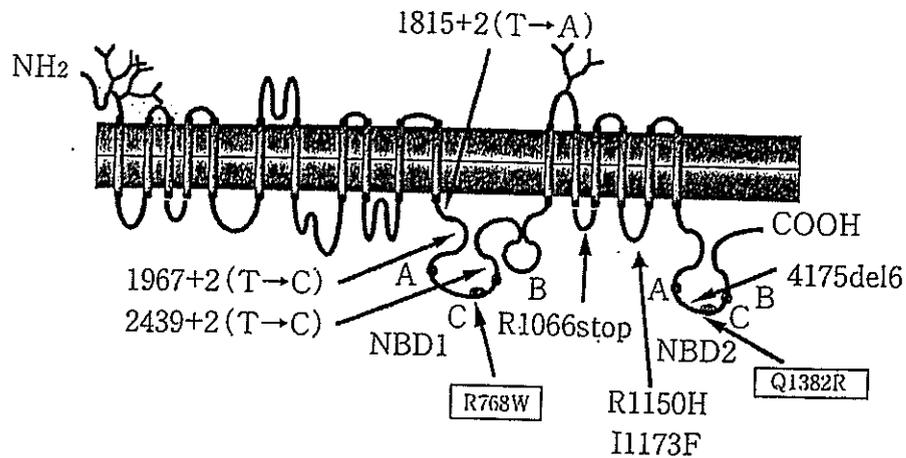
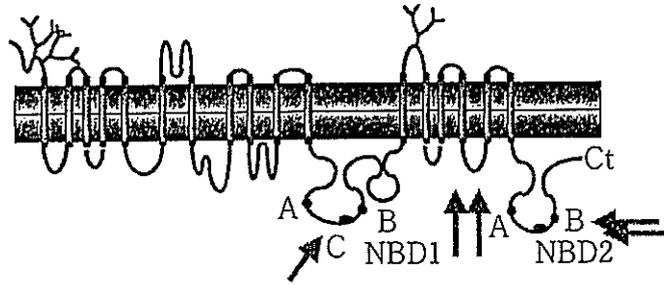


図8 Dubin-Johnson 症候群における *MRP2/cMOAT* 遺伝子の変異部位

に参与している可能性が考えられる。ただし、人工的な変異導入による解析から、グルタチオンメチルフルオレセインの排出には膜貫通領域6のK324、膜貫通領域9のK483、膜貫通領域16のR1210、膜貫通領域17のR1257が基質輸送に必須であること、膜貫通領域16のR1230がサイクロスポリンAの結合に必須であることが報告されており、膜貫通ドメインにも機能に必要な領域が存在することは間違いないであろう³⁷⁾。他グループからの報告も合わせ、現在7種類の変異が同定されている(図8)。

2.3 *MRP2/cMOAT* 遺伝子変異と病態

MRP2/cMOAT 遺伝子変異と病態との関連が最近明らかにされつつある。患者の肝臓についての免疫染色や mRNA の解析から、変異により cMOAT 蛋白質や *MRP2/cMOAT* mRNA が不安定になると推察されている。R768W 変異により cMOAT 蛋白質は合成後の修飾、成熟過程が進行できないことから、このアルギニンが *MRP2/cMOAT* 成熟蛋白質の形成と三次元構造を維持するために必須の領域であることが示唆された。一方、最近明らかにされたサルモネラ HIS P 蛋白質の X 線構造解析の結果を cMOAT 蛋白質にあてはめると、Q1382R 変異はちょうど ATP 分子の g 位と相互作用することが予測されている位置に相当する。このことから Q1382R 変異により *MRP2/cMOAT* 蛋白質の加水分解能が低下していることが推測され、実際にバナジン酸を用いた vanadate induced nucleotide trapping assay により、Q1382R 変異体では加水分解活性の上昇が観察されないことが示された(図9, 10)³⁸⁾。



D/J 変異	部位	成熟	輸送活性
R768W	NBD1 C モチーフ	欠損	
R1150H	MSD3	OK	欠損
I1173F	MSD3	欠損	
Q1382R	NBD2C モチーフ	OK	欠損 (ATP の加水分解)
4175del6	NBD2C モチーフ	欠損	

図 9 Dubin-Johnson 症候群の変異と機能障害の病因

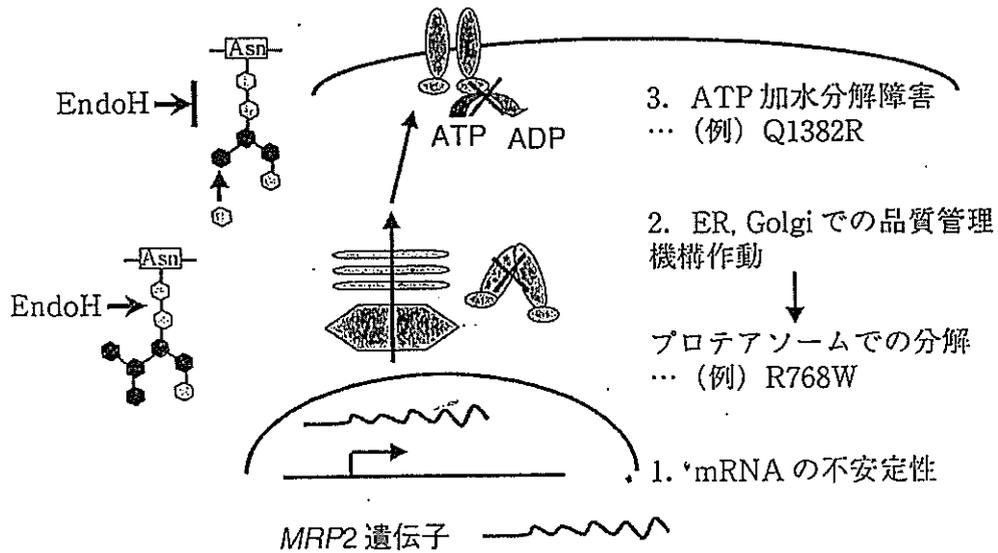


図 10 MRP2 遺伝子変異と機能障害

前述のように、Dubin-Johnson 症候群では血中の抱合型ビリルビン量が増加しているわけであるが、抱合は肝細胞内で行われていると考えられる。すなわち、Dubin-Johnson 症候群では cMOAT 蛋白質の機能欠損により、抱合型ビリルビンが胆管側に排出されずに血中（類洞側，図 6）に逆輸送されると考えられるので、抱合型ビリルビンを類洞側に輸送するトランスポーターが想定される。抱合型ビリルビンを基質にできること，類洞側に局在すること，胆汁うっ

滞により発現亢進されることなどから、MRPサブファミリーのMRP3がこの輸送を担っていると考えられる³⁹⁾。

患者家族の遺伝子解析の結果から、もう一つ重要な点が推測される。すなわち、片方のアレルのみが変異したヘテロ接合型を示す場合には、ビリルビン値は正常であるが、尿中コプロポルフィリンI分画の中度の増加が認められる(表2)。このことは、基質によっては片方のアレルの変異のみで排出に影響を及ぼしうることを示唆している。この結果は、*MRP2/cMOAT* 遺伝子が薬物への感受性の個人差や体内動態に関与しうる因子として、今後さらに解明されるべきであることを示している。

3. 胆汁酸の腸肝循環と MRP3

3.1 腸肝循環

腸肝循環は、胆汁酸およびコレステロールの生体内恒常性の維持において重要な役割を担っている。腸管腔内に存在する胆汁酸は、腸管細胞の腸管腔側に発現している胆汁酸輸送体 (ileal bile acid transporter) によって腸管細胞内に取り込まれることが報告されているが、取り込まれた腸管細胞内の胆汁酸がいかにして細胞の基底側膜を介し血中へと排泄され、循環するかについては、詳細は不明である。腸管細胞の基底側膜には、ABCトランスポーターの一つであるMRP3蛋白質が発現しており、胆汁酸を基質として細胞内から細胞外へと輸送する機能を有しているとの報告がなされている。MRP3が腸管細胞内の胆汁酸によりその発現を誘導され、胆汁酸を循環血中へと排出する役割を通して腸肝循環に関与していると考えられている。ここでは、MRP3の胆汁酸に対する発現応答と転写制御について概説する。

3.2 胆汁酸における MRP3 遺伝子の発現調節

胆汁酸は肝細胞においてコレステロールから合成され、肝細胞から胆管を経て腸管腔内へ排泄され、その90%以上が腸管上皮を通して再吸収され、門脈血を経て肝臓へと戻る。この腸肝循環は胆汁酸およびコレステロールの生体内恒常性の維持に重要な役割を担っている^{40)~41)}。肝臓における胆汁酸合成系では、胆汁酸は自身のコレステロールからの生合成を負に制御している。胆汁酸合成

経路における律速酵素である CYP7A1 は、胆汁酸と特異的に結合する核内レセプターであるファルネソイド X レセプター (FXR) を介した転写レベルでの発現制御を受けている^{45),46)}。また、CYP7A1 遺伝子の転写は、胆汁酸と結合した FXR により発現調節を受ける核内レセプター small heterodimer partner (SHP) と α -1 fetoprotein transcription factor (FTF) によっても負に制御されている⁴⁷⁾。

胆汁酸の吸収/排泄系では、肝臓および腸に発現している数種のトランスポーターが胆汁酸輸送によって腸肝循環に関与している。肝細胞の基底側膜に発現しているトランスポーター NTCP により、門脈血中の胆汁酸は肝細胞内に取り込まれ、胆管側膜に発現しているトランスポーター BSEP によって、細胞内胆汁酸は胆管内へと排泄される。MRP2 は、肝細胞の胆管側膜に発現しており、胆汁酸の胆管内への排泄に関与している。一方、腸管では、腸管腔内の胆汁酸は腸管上皮細胞の腸管腔側に発現している IBAT (ileal bile acid transporter) によって腸管上皮細胞内へと再吸収される。再吸収された細胞内胆汁酸は、FXR と結合し、細胞質に存在し、胆汁酸の細胞内輸送に働くとされている ileal bile acid-binding protein (IBABP) の遺伝子発現を亢進させることが明らかにされてきた⁴⁸⁾。しかし、腸管細胞内の胆汁酸が、いかにして細胞の基

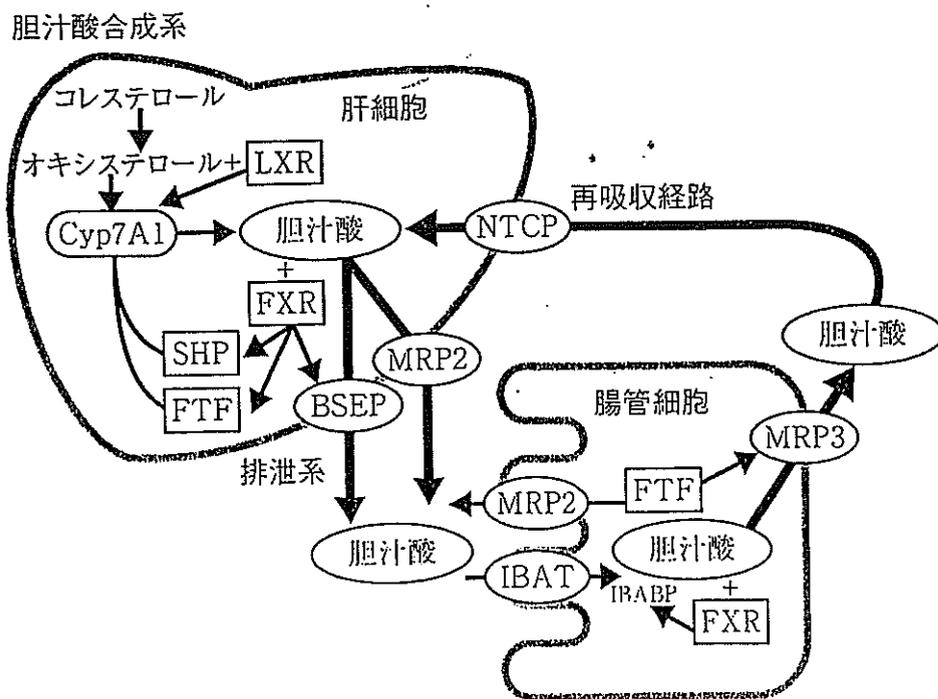


図 11 胆汁酸の腸肝循環における MRP3 の予想される役割

底側膜を介して血中へと排泄されるのかについては、詳細は不明である。

MRP3 が胆汁酸や 17β -エストラジオール、および数種類の抗がん剤を基質として輸送することが報告されている。MRP1 と MDR1 が肝細胞において高発現しているのに対し、腸管細胞においては MRP1, MDR1, および BSEP の発現は非常に低いか、ほとんど発現していない。一方、MRP3 の発現は、ヒトおよびラットの腸管細胞の基底側膜に発現しており、このことは MRP3 が腸における有機アニオンの輸送に関与することを示唆している。MRP3 は胆汁酸を基質とすること、および腸管細胞の基底側膜に発現していることから、MRP3 が胆汁酸を腸管細胞内から循環血流へと輸送し、胆汁酸の細胞内蓄積を防ぐ役割を担うとともに、胆汁酸の腸肝循環に関与することが予想される。さらに、胆汁酸により、腸管上皮細胞の管腔側膜に発現する IBAT の発現が誘導される。最近、腸管細胞において MRP3 mRNA 発現が胆汁酸に応答して上昇することが観察され MRP3 プロモーター上の FTF 認識配列を含む領域がその制御に重要であることが示された。MRP3 の発現が胆汁酸によって転写レベルで正の制御を受け、腸管からの胆汁酸排泄において腸肝循環に関与し、胆汁酸の生体内恒常性維持を担うことが示唆された (図 11)⁹⁹⁾。

3.3 FTF (α -1 fetoprotein transcription factor)

ヒト大腸細胞株に胆汁酸の一つであるケノデオキシコール酸を処理すると、MRP3 mRNA の発現が上昇する。プロモーター上の翻訳開始点より上流 -229 bp から -138 bp の領域に胆汁酸応答領域があり、同領域には、核内オーファンレセプターの一つであり、肝臓において胆汁酸生合成系の律速酵素の発現制御を担うとされている転写因子 FTF (α -1 fetoprotein transcription factor) の認識配列が存在していた。これは、FTF が肝における胆汁酸合成制御に関わる一方、腸管での胆汁酸に対する MRP3 発現の制御に関わることを示し、また胆汁酸に対して MRP3 の発現が亢進し、胆汁酸を腸管から血中へ排泄することで、胆汁酸の腸肝循環に関与する可能性が示唆された。

FTF はオーファンレセプターの一つである Ftz-F1 ファミリーの構成員であり、肝臓、膵臓、および腸管において発現が認められ、肝細胞内では胆汁酸生合成系の制御に関与することが報告されている。胆汁酸合成経路における律速酵素である CYP7A1 遺伝子の胆汁酸による負の制御は、胆汁酸と結合した胆汁酸

レセプターである FXR によって発現が誘導される核内レセプター small heterodimer partner (SHP) と FTF とが *CYP7A1* 遺伝子の転写に作用することによってなされている。さらに、FTF は同じく胆汁酸合成経路における律速酵素である 12α 水酸化酵素遺伝子の発現をも制御することが明らかにされた。これらのことから、FTF が胆汁酸およびコレステロール代謝の恒常性維持において重要な役割を担っていることがわかる⁵⁰⁾⁻⁵²⁾。

3.4 核内レセプターと胆汁酸代謝制御

近年、胆汁酸およびコレステロールの代謝の制御に、いくつかの核内レセプターが関与することが明らかになった。オキシステロールを処理したマクロファージにおいて、核内レセプターである LXR を介した、コレステロールおよびリン脂質の輸送体 ABCA1 の発現の著明な上昇が認められている。核内レセプター LXR および FXR が RXR とヘテロダイマーを形成し、ABCA1 と *CYP7A1* 遺伝子の発現を制御し、コレステロールの生体内恒常性維持に関与していることを報告している⁵³⁾。肝細胞において、胆汁酸は自身の合成に対して負の制御を行うこと、胆汁酸の腸肝循環を阻害するとコレステロールおよび胆汁酸の合成が亢進すること、FTF を含む核内レセプターがその制御に関与することは、胆汁酸によって誘導される *MRP3* 転写制御が FTF を介して行われている可能性を支持するものと思われる。近年、肝細胞における FTF 発現が胆汁酸により活性化した FXR によって誘導され、標的遺伝子の発現制御をしていることが報告された⁵⁴⁾。腸管細胞における FTF 遺伝子の胆汁酸による発現変化も、肝細胞と同様の制御を受けているかもしれない。

文 献

- 1) 内海 健, 和田守正, 桑野信彦: 血液・免疫・腫瘍, 3, 117 (1998).
- 2) W. T. Beck: *Biochem. Pharmacol.*, 36, 2879 (1987).
- 3) A. Sparreboom, R. Danesi, Y. Ando, J. Chan & W. D. Figg: *Drug Resist. Updat.*, 6, 71 (2003).
- 4) M. Dean: "The Human ATP-binding Cassette (ABC) Transporter Super Family". NCBI Monographs, National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA (2002).
- 5) M. F. Fromm: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 1295 (2002).
- 6) J. H. Lin & M. Yamazaki: *Clin. Pharmacokinet.*, 42, 59 (2003).
- 7) A. H. Schinkel, U. Mayer, E. Wagenaar, C. A. Mol, L. van Deemter, J. J. Smit, M. A. van der Valk, A. C. Voordouw, H. Spits, O. van Tellingen, J. M. Zijlmans, W. E. Fibbe