

Fig. 5. Inhibitory effect of TLC-S on the ATP-dependent uptake of [3 H]TC. [3 H]TC uptake by membrane vesicles (5 μ g) prepared from hBSEP-transfected (A), rBsep-transfected (B) HEK293 cells was determined at 37 $^{\circ}$ C for 2 min with 5 mM ATP or AMP in medium containing 0.8 μ M [3 H]TC, with or without TLC-S at the indicated concentrations. The ATP-dependent uptake values were calculated by subtracting the values in the absence of 5 mM ATP from those in the presence of 5 mM ATP. Each point and bar represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations.

system and/or post-translational modifications of hBSEP and rBsep in our mammalian cell system may have influenced CA transport by hBSEP and rBsep.

The examination using the rank order determined by the initial velocity and intrinsic clearance values hardly showed any species difference in hBSEP/rBsep function. However, a species difference was detected when the ATP-dependent uptake of a series of bile salts was normalized by that of [3 H]TC. This quantitative evaluation demonstrated that hBSEP accepted glycine-conjugated bile salts to an extent

that was approximately 2-fold greater than rBsep, while there were no differences in the transport properties of taurine-conjugated bile salts, except for TCDC, which was especially well transported by rBsep (Fig. 4). These results indicate that the transport properties of hBSEP/rBsep match the biliary bile salt composition enriched by glycine conjugates in humans compared with rats. In addition, these species difference does not depend on the differences in the affinity for the substrate, since a species difference corresponding to the quantitative evaluation results (Fig. 4) was not observed for the K_m values

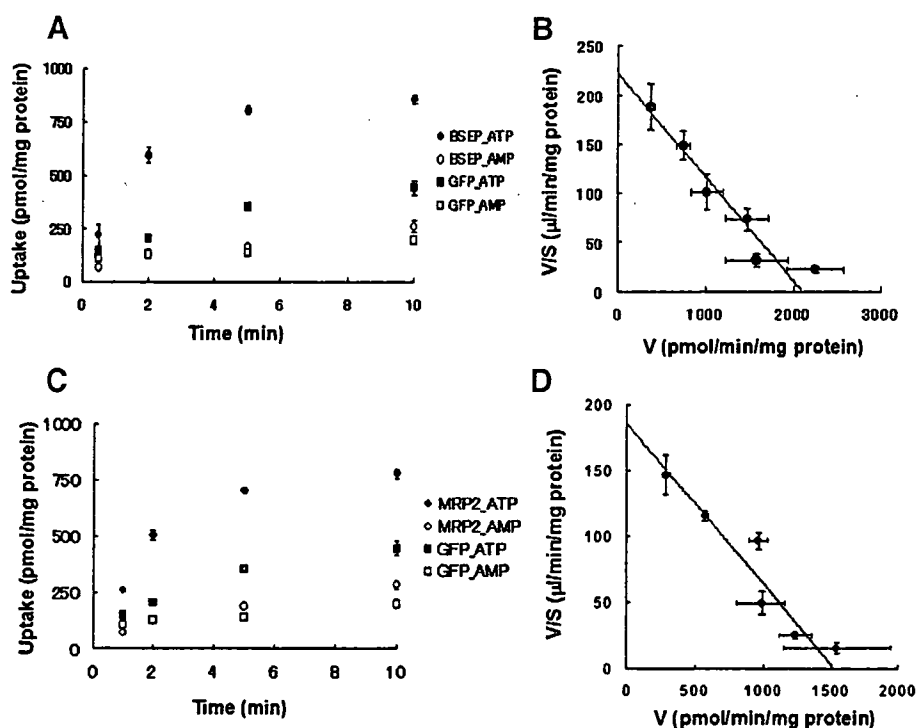


Fig. 6. Uptake of [3 H]TLC-S by hBSEP and hMRP2. A and C show the time profile for the hBSEP-mediated (A) and hMRP2-mediated (C) uptake of [3 H]TLC-S. Membrane vesicles (5 μ g) prepared from hBSEP-transfected (circles), hMRP2-transfected (circles) and GFP-transfected (squares) HEK293 cells were incubated at 37 $^{\circ}$ C with 5 mM ATP (closed symbols) or AMP (open symbols) in medium containing 1 μ M [3 H]TLC-S and 1 μ M TLC-S. B and D show the saturation of the hBSEP-mediated (B) and hMRP2-mediated (D) uptake of [3 H]TLC-S. The uptake of 1 μ M [3 H]TLC-S by hBSEP- and hMRP2-expressing membrane vesicles (5 μ g) were determined at 37 $^{\circ}$ C for 2 min with 5 mM ATP or AMP in medium containing 0.5–100 μ M of TLC-S. The ATP-dependent uptake was obtained by subtracting the values in the absence of 5 mM ATP from those in the presence of ATP. Results are shown as in an Eadie–Hofstee plot. The solid line represents the fitted line obtained by non-linear regression analysis. Each point and bar represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations.

(Table 1). However, these species differences are not enough to explain how the different bile salt composition between human and rat is formed by the species difference of transport properties for hBSEP/rBsep. Most of the bile salts transported by hBSEP and rBsep are recycling bile salts. The steady state composition of the circulating bile salts for amino acid moiety is determined by the balance between the mode of N-acetylamidation in the hepatocyte, bacterial deconjugation in the small intestine and the extent of intestinal conservation of the conjugated and unconjugated moieties, as has been reported [34–37].

The result of this study for glycine- and taurine-conjugated bile salts differs only slightly from the previous report by Noe et al. which concluded that the transport properties of hBSEP and rBsep are very similar [7]. Noe et al. characterized the transport properties of hBSEP for TC, GC, TCDC and TUDC, and then examined the species difference in hBSEP/rBsep using K_m values and the rank order of intrinsic clearance values [7], while we characterized the transport properties of hBSEP and rBsep for another eight bile salts in addition to TC, GC, TCDC and TUDC, and then examined the species difference of hBSEP/rBsep by quantitative evaluation (Fig. 4). It is possible that the minor difference between present study and that by Noe et al. is due to the methodological differences, since the results for TC, GC, TCDC and TUDC reported by Noe et al. [7] agreed with those in the present study.

In addition to the glycine- and taurine-conjugated bile salts, TLC-S was ATP-dependently transported by hBSEP, but hardly transported by rBsep (Fig. 3). This species difference was further confirmed by the inhibitory effect on the ATP-dependent uptake of [3 H]TC by hBSEP- and rBsep-expressing membrane vesicles (Fig. 5). These results were unexpected. Since, although there have not been any reports examining TLC-S transport by hBSEP, it is generally considered that the biliary excretion of sulfated bile salts is mediated by hMRP2, not hBSEP in humans as well as in rats as described in a number of reports [8,14–16,31]. Several in vivo studies have shown that the biliary excretion of intravenously administered sulfated bile salts amidates were significantly impaired in Groningen Yellow (GY) [14] and Eisai hyperbilirubinemic rats (EHBR) [15] which are Mrp2-deficient rats. Moreover, more direct evidence was provided by in vitro studies showing that the ATP-dependent transport of sulfated bile salts amidates can be observed in isolated bile canalicular membrane vesicles (CMVs) from healthy Sprague–Dawley rats as well as from membrane vesicles isolated from cells transfected with the cDNA for rMrp2. Transport of sulfated bile salts amidates was not observed in CMV from EHBR as well as in membrane vesicles isolated from cells transfected with the cDNA for rBsep [8,16]. Another report described the transcellular transport of TLC-S across MDCKII co-expressing hOATP2 and hMRP2 [31]. Kinetic analysis revealed that the K_m value of TLC-S for hBSEP and hMRP2 was 9.5 μ M and 8.2 μ M, respectively, indicating that hBSEP and hMRP2 have a similar high affinity for TLC-S (Fig. 6). Thus, there seems convincing

evidence that TLC-S is transported by both hMRP2 and hBSEP.

Lithocholate (LCA) is formed in the colon by bacterial 7-dehydroxylation of CDCA and UDCA. It is toxic in animals that lack the ability to detoxify it. In humans, LCA is detoxified by sulfation in hepatocyte which prevents enterohepatic circulation. In rodents, LCA is detoxified by hydroxylation, rather than sulfation [25]. In humans, efficient hepatic elimination of LCA sulfates occurs because of its being a substrate for both hMRP2 and hBSEP. The lack of LCA sulfates in the urine of Dubin–Johnson syndrome patients (our unpublished observations) can now be explained by its being excreted by hBSEP.

hBSEP/rBsep was considered as a specific transporter for monovalent bile salts [5–8,16], although some drugs, such as sulindac, were suggested as potential substrates [38,39]. However, the present study demonstrates that hBSEP accepts the glycine-conjugated bile salts in preference to rBsep and also that hBSEP can transport divalent bile salts such as TLC-S (Fig. 4). This observation has led to the suggestion that hBSEP exhibits a wider substrate specificity than rBsep. Moreover, this suggestion is supported by our recent finding that pravastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, is transported by hBSEP but not rBsep [40]. The importance of the amino acid residues located in the membrane-spanning domains for the substrate recognition of the transporter was previously demonstrated for hMDR1 [41], which belongs to the same subfamily as hBSEP, and rMrp2 [42,43]. Therefore, the cationic amino acids in membrane-spanning domain of hBSEP, such as histidine at 1013 of hBSEP, which are not conserved in that of rBsep may play a key role in the recognition of divalent bile salts.

In conclusion, we demonstrated that hBSEP accepts TLC-S and glycine-conjugated bile salts in preference to rBsep, while there are no differences between hBSEP and rBsep in the transport properties of taurine-conjugated bile salts, except that TCDC is transported more efficiently by rBsep. These results define the substrate specificity of hBSEP compared with rBsep. It seems most probable that hBSEP may be involved in the biliary excretion of endogenous and exogenous substrates other than bile salts.

Acknowledgements

We thank Mr. Masakazu Hirouchi for construction of hMRP2 expression system, Dr. Hidetaka Akita and Ms. Sachiko Mita for construction of rBsep expression system. This work was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas Epithelial Vectorial Transport 12144201 and Grant-in-Aid for Center of Excellence (COE) from The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) of Japan. Work in the laboratory of Alan F. Hofmann is supported by NIH Grant DK 64891.

References

- [1] P.J. Meier, B. Stieger, Bile salt transporters, *Annu. Rev. Physiol.* 64 (2002) 635–661.

- [2] M. Trauner, J.L. Boyer, Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 633–671.
- [3] B. Hagenbuch, B. Stieger, M. Foguet, H. Lubbert, P.J. Meier, Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 10629–10633.
- [4] B. Hagenbuch, P.J. Meier, Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter, *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 1326–1331.
- [5] J.A. Byrne, S.S. Strautnieks, G. Mieli-Vergani, C.F. Higgins, K.J. Linton, R.J. Thompson, The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors, *Gastroenterology* 123 (2002) 1649–1658.
- [6] T. Gerloff, B. Stieger, B. Hagenbuch, J. Madon, L. Landmann, J. Roth, A.F. Hofmann, P.J. Meier, The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 10046–10050.
- [7] J. Noe, B. Stieger, P.J. Meier, Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver, *Gastroenterology* 123 (2002) 1659–1666.
- [8] B. Stieger, K. Fattinger, J. Madon, G.A. Kullak-Ublick, P.J. Meier, Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver, *Gastroenterology* 118 (2000) 422–430.
- [9] R.M. Green, F. Hoda, K.L. Ward, Molecular cloning and characterization of the murine bile salt export pump, *Gene* 241 (2000) 117–123.
- [10] J. Noe, B. Hagenbuch, P.J. Meier, M.V. St-Pierre, Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system, *Hepatology* 33 (2001) 1223–1231.
- [11] H. Suzuki, Y. Sugiyama, Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2, *Semin. Liver Dis.* 18 (1998) 359–376.
- [12] J. Konig, A.T. Nies, Y. Cui, I. Leier, D. Keppler, Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance, *Biochim. Biophys. Acta* 1461 (1999) 377–394.
- [13] D. Keppler, J. Konig, Hepatic secretion of conjugated drugs and endogenous substances, *Semin. Liver Dis.* 20 (2000) 265–272.
- [14] F. Kuipers, M. Enserink, R. Havinga, A.B. van der Steen, M.J. Hardonk, J. Fevery, R.J. Vonk, Separate transport systems for biliary secretion of sulfated and unsulfated bile acids in the rat, *J. Clin. Invest.* 81 (1988) 1593–1599.
- [15] H. Takikawa, N. Sano, T. Narita, Y. Uchida, M. Yamanaka, T. Horie, T. Mikami, O. Tagaya, Biliary excretion of bile acid conjugates in a hyperbilirubinemic mutant Sprague–Dawley rat, *Hepatology* 14 (1991) 352–360.
- [16] H. Akita, H. Suzuki, K. Ito, S. Kinoshita, N. Sato, H. Takikawa, Y. Sugiyama, Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump, *Biochim. Biophys. Acta* 1511 (2001) 7–16.
- [17] H. Hayashi, T. Takada, H. Suzuki, H. Akita, Y. Sugiyama, Two common PFIC2 mutations are associated with the impaired membrane trafficking of BSEP/ABCB11, *Hepatology* 41 (2005) 916–924.
- [18] P.L. Jansen, S.S. Strautnieks, E. Jacquemin, M. Hadchouel, E.M. Sokal, G.J. Hooiveld, J.H. Koning, A. De Jager-Krikken, F. Kuipers, F. Stellaard, C.M. Bijleveld, A. Gouw, H. Van Goor, R.J. Thompson, M. Muller, Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis, *Gastroenterology* 117 (1999) 1370–1379.
- [19] J.R. Plass, O. Mol, J. Heegsma, M. Geuken, J. de Bruin, G. Elling, M. Muller, K.N. Faber, P.L. Jansen, A progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 mutation causes an unstable, temperature-sensitive bile salt export pump, *J. Hepatol.* 40 (2004) 24–30.
- [20] S.S. Strautnieks, L.N. Bull, A.S. Knisely, S.A. Kocoshis, N. Dahl, H. Arnell, E. Sokal, K. Dahan, S. Childs, V. Ling, M.S. Tanner, A.F. Kagalwalla, A. Nemeth, J. Pawlowska, A. Baker, G. Mieli-Vergani, N.B. Freimer, R.M. Gardiner, R.J. Thompson, A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis, *Nat. Genet.* 20 (1998) 233–238.
- [21] L. Wang, C.J. Soroka, J.L. Boyer, The role of bile salt export pump mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type II, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 965–972.
- [22] C.C. Paulusmä, M. Kool, P.J. Bosma, G.L. Scheffer, F. ter Borg, R.J. Scheper, G.N. Tytgat, P. Borst, F. Baas, R.P. Oude Elferink, A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin–Johnson syndrome, *Hepatology* 25 (1997) 1539–1542.
- [23] K. Hashimoto, T. Uchiumi, T. Konno, T. Ebihara, T. Nakamura, M. Wada, S. Sakisaka, F. Maniwa, T. Amachi, K. Ueda, M. Kuwano, Trafficking and functional defects by mutations of the ATP-binding domains in MRP2 in patients with Dubin–Johnson syndrome, *Hepatology* 36 (2002) 1236–1245.
- [24] V. Keitel, J. Kartenbeck, A.T. Nies, H. Spring, M. Brom, D. Keppler, Impaired protein maturation of the conjugate export pump multidrug resistance protein 2 as a consequence of a deletion mutation in Dubin–Johnson syndrome, *Hepatology* 32 (2000) 1317–1328.
- [25] I.M. Arias, N. Fausto, et al., *The Liver*, Third ed., Raven press, Ltd., New York, 1994.
- [26] Y. Siow, A. Schurr, G.C. Vitale, Diabetes-induced bile acid composition changes in rat bile determined by high performance liquid chromatography, *Life Sci.* 49 (1991) 1301–1308.
- [27] S. Sorscher, J. Lillienau, J.L. Meinkoth, J.H. Steinbach, C.D. Scheingart, J. Feramisco, A.F. Hofmann, Conjugated bile acid uptake by *Xenopus laevis* oocytes induced by microinjection with ileal Poly A⁺ mRNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186 (1992) 1455–1462.
- [28] W.C. Duane, C.D. Scheingart, H.T. Ton-Nu, A.F. Hofmann, Validation of [22,23-³H]cholic acid as a stable tracer through conversion to deoxycholic acid in human subjects, *J. Lipid Res.* 37 (1996) 431–436.
- [29] S. Mita, H. Suzuki, H. Akita, B. Stieger, P.J. Meier, A.F. Hofmann, Y. Sugiyama, Vectorial transport of bile salts across MDCK cells expressing both rat Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide and rat bile salt export pump, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 288 (2005) G159–G167.
- [30] M. Hirouchi, H. Suzuki, M. Itoda, S. Ozawa, J. Sawada, I. Ieiri, K. Ohtsubo, Y. Sugiyama, Characterization of the cellular localization, expression level, and function of SNP variants of MRP2/ABCC2, *Pharm. Res.* 21 (2004) 742–748.
- [31] M. Sasaki, H. Suzuki, K. Ito, T. Abe, Y. Sugiyama, Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin–Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2), *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6497–6503.
- [32] H. Wolters, F. Kuipers, M.J. Slooff, R.J. Vonk, Adenosine triphosphate-dependent taurocholate transport in human liver plasma membranes, *J. Clin. Invest.* 90 (1992) 2321–2326.
- [33] B. Stieger, B. O’Neill, P.J. Meier, ATP-dependent bile-salt transport in canalicular rat liver plasma-membrane vesicles, *Biochem. J.* 284 (Pt. 1) (1992) 67–74.
- [34] N.E. Hoffman, A.F. Hofmann, Measurement of bile and acid kinetics by isotope dilution in man, *Gastroenterology* 67 (1974) 887–897.
- [35] N.E. Hoffman, A.F. Hofmann, Metabolism of steroid and amino acid moieties of conjugated bile acids in man: V. Equations for the perturbed enterohepatic circulation and their application, *Gastroenterology* 72 (1977) 141–148.
- [36] A.F. Hofmann, *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3rd ed., Raven Press, New York, 1994.
- [37] A.F. Hofmann, Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile acid: relevance to drug hepatotoxicity, *Drug Metab. Rev.* 36 (2004) 703–722.
- [38] V. Lecreur, D. Sun, P. Hargrove, E.G. Schuetz, R.B. Kim, L.B. Lan, J.D. Schuetz, Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein, *Mol. Pharmacol.* 57 (2000) 24–35.
- [39] U. Bolder, N.V. Trang, L.R. Hagey, C.D. Scheingart, H.T. Ton-Nu, C. Cerre, R.P. Elferink, A.F. Hofmann, Sulindac is excreted into bile by a canalicular bile salt pump and undergoes a cholehepatic circulation in rats, *Gastroenterology* 117 (1999) 962–971.

- [40] M. Hirano, K. Maeda, H. Hayashi, H. Kusuhara, Y. Sugiyama, Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a non-bile acid substrate, pravastatin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314 (2005) 876–882.
- [41] T.W. Loo, D.M. Clarke, Merck Frosst Award Lecture 1998. Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein, *Biochem. Cell. Biol.* 77 (1999) 11–23.
- [42] K. Ito, H. Suzuki, Y. Sugiyama, Single amino acid substitution of rat MRP2 results in acquired transport activity for taurocholate, *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.* 281 (2001) G1034–G1043.
- [43] K. Ito, H. Suzuki, Y. Sugiyama, Charged amino acids in the transmembrane domains are involved in the determination of the substrate specificity of rat Mrp2, *Mol. Pharmacol.* 59 (2001) 1077–1085.

2) 抗がん剤の効果・副作用に関連する薬物代謝酵素・トランスポーターの遺伝子多型

(1) はじめに

旧来より、薬物の効果・副作用には、個人差が存在することが経験的に知られており、現在では、その要因として、薬物動態学的な要因 (pharmacokinetics) と、薬力学的な要因 (pharmacodynamics) の2つに大別して考えるのが一般的である。すなわち前者は、投与薬物の循環血中ならびに標的組織中の経時的な濃度推移の個人差であり、それらは、各組織において吸収・分布・代謝・排泄を担う、代謝酵素・トランスポーターなどの機能・発現の個人差と考えることができる。

一方、後者は、同じ薬物濃度で暴露された標的細胞であるにも関わらず効果の強度にみられる個人差であり、薬物の標的レセプターやその下流にあるシグナル伝達分子や転写因子などの機能・発現変化に起因するものと考えられる (図1)。特に、抗がん剤がターゲットとする悪性腫瘍については、腫瘍内血管形成の不均一さなどにより、抗がん剤自身の暴露が腫瘍内の細胞によって異なることや、栄養分や酸素の供給など1つの腫瘍内でも個々の細胞を取り巻く環境は異なっており、それに伴い細胞により標的関連分子の発現も異なると考えられている。また、腫瘍細胞は、宿主の遺伝的背景の個人差以外に、薬剤耐性などに関する薬物排出トランスポーターや標的分子の遺伝子変化をしば

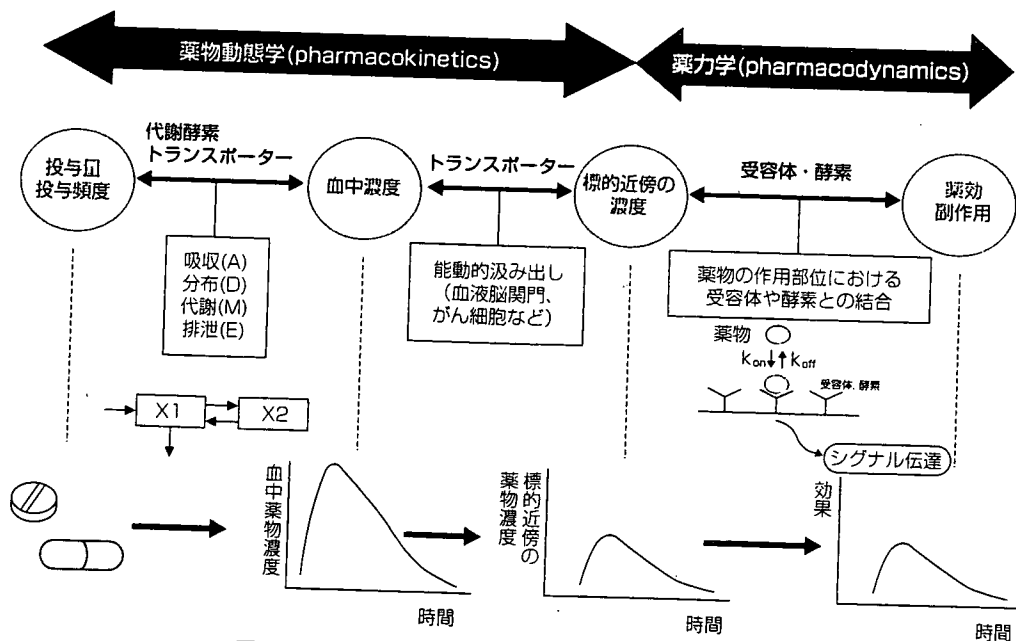


図1 薬物が投与後効果、副作用を発現するまでの過程 (佐藤 均, ファーマコキネティクス 演習による理解, 杉山雄一・山下伸二・加藤基浩 編, 南山堂より改変引用)

しば後天的に獲得することが知られている。したがって、腫瘍における薬物の暴露や効果を決定する遺伝子の変異は、個人差よりはむしろ腫瘍細胞ごとに異なると考えられる。

一方、薬物の全身における薬物動態を支配する分子の機能・発現は、個人の普遍的な遺伝的背景に支配されており、容易にタイピングをすることが可能なことから、薬物の効果・副作用の個人差を生む要因の一つとして早くから注目を集めてきた。薬物動態に関与する異物解毒系の代謝酵素・トランスポーター群は、いずれも基質認識性が広範であることが多く、一つの分子の機能変化が、複数の薬物の動態に影響を与えることも特徴として挙げられる。特に、抗がん剤においては、濃度-効果曲線を考えた場合、一般の薬物と比較して、治療効果の発現と副作用・毒性発現の濃度域が接近しており、安全域が狭いこと、また副作用が生命の危険を伴うような重篤なものが多いことから、投与する前にあらかじめ薬物動態に関連する分子の機能を遺伝子情報から予測して、個人の代謝・輸送能力に合わせた処方設計を行うことで、全身の薬物動態をコントロールすることは、副作用回避のために最も重要なことであるといえる。また、医薬品開発過程においても、これまでの治験では、投与量が固定されており、結果として、副作用を発現するヒトや効果の無いヒトが混在しており、集団全体としての薬効評価を難しくしていたが、例えば、あらかじめ薬物の効果に関係する遺伝子について診断を行うことで、レスポナー・ノンレスポナーを分類することや、代謝酵素・トランスポーターの遺伝子診断により、治療に適切な薬物濃度を確保できるような投与量を層別化して設定することで、適した患者群に対し、適切な処方を通して薬効を最大限引き出すことができると考えられる。本総説では、特に薬物動態を制御する分子群である、代謝酵素・トランスポーターの遺伝子多型と抗がん剤の効果・副作用に与える影響について例を挙げながら、個別化医療への可能性も含め解説する。

(2) thiopurine S-methyltransferase (TPMT)とプリン代謝拮抗薬

プリン代謝拮抗薬である, mercaptopurine や thioguanine, azathiopurine は、それぞれ、リンパ芽球性白血病や骨髄芽球性白血病の症状の寛解に対し汎用されている。これら薬剤は全てプロドラッグであり、細胞内の hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) によ

り一連の thioguanine nucleotides に変換されて核酸代謝系に拮抗することで活性を示す一方、TPMTによりS-メチル化されることで、不活性化することが知られている。旧来より、患者の一部で、代謝拮抗作用の増強や、重篤な骨髄抑制により投与量の減量をせまられるケースが知られており、現在では、この主要原因がTPMTの遺伝子多型による活性の個人差で説明されることが解明されている。Caucasianにおいて、赤血球中のTPMT活性の分布は3峰性を示すことが知られており、全体の約0.3%でTPMT活性がほぼ欠損し、約10%については、残り90%のヒトの半分程度のTPMT活性を示すことが示されている¹⁾。TPMTの遺伝子解析の進展に伴い、活性が欠損・低下する患者は、TPMT活性がほぼ無くなる遺伝子変異をホモあるいはヘテロで有する患者とほぼ対応することがわかってきた。現在までに、11種類程度のアレルがTPMTの活性低下と関連することが明らかとなってきた(図2)。とりわけ、Caucasianにおいては、TPMT*2 (G238C; Ala→Pro), TPMT*3A (G640A+A719G; Ala→Thr+Tyr→Cys), TPMT*3B (A719G; Tyr→Cys) の3種類の変異がTPMT活性を減少させるアレルの95%を占めており、これら3種のアレルを調べることでほぼTPMT活性の遺伝子診断が可能であるといえる²⁾。これら変異による活性低下の原因は、in vitro実験の結果、いずれも変異TPMTのプロテアソーム系による分解の促進が示唆されている^{3) 4)}。また、TPMT遺伝子の変異には大きな民族差が観察されている。例えば、Caucasianにおいて

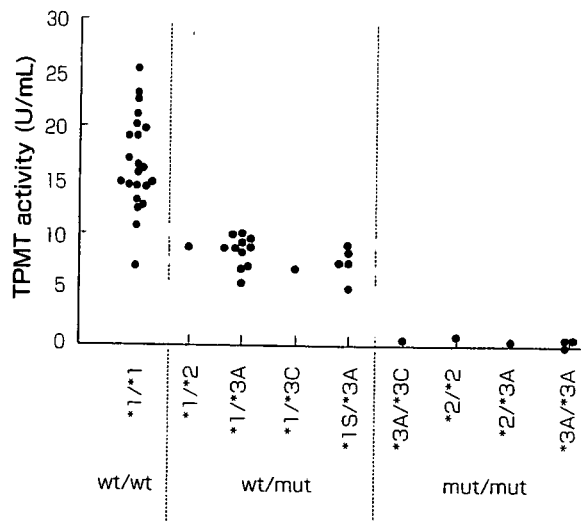


図2 TPMTの遺伝子型と、酵素活性の間の相関

*1が野生型と定義している。

(Yates CR, et al. 1997⁸⁾ より引用)

は、*3Aが最も多く、4~6%を占めており、ついで、*2、*3Bがそれぞれ0.3~0.8%程度占めている^{5,6,7,8)}のに対して、Southwest Asian (Indian, Pakistani) においては、*3Aが1%見られるのみで、*2、*3Cは全く見られず⁵⁾、またJapanese, Chineseにおいては、*3Cが0.8%、2.3%であり、*2、*3Aは見られていない^{5) 9)}。さらに最近、野生型アレルをホモで有する患者においてもTPMT活性に数倍のばらつきが観察されており、その原因の候補として、転写開始点から36~116塩基上流にある17~18塩基単位の繰り返し配列の出現回数(4~8回)による転写能力の違いが示唆されている¹⁰⁾。TPMTの活性については、赤血球における活性と白血球細胞や他の臓器の細胞における活性の間には強い相関が認められていることから、赤血球を用いたTPMT活性の予測は可能だが^{11) 12) 13)}、輸血後の患者では、ドナーの血液由来の活性と誤って判断してしまう事例が報告されており¹⁴⁾、患者の遺伝子診断の方がより正確な判断が可能である。欧米ではTPMT遺伝子診断キットが販売され、実際の医療において、投薬前に診断を行い投与設計を行っている施設もある。TPMTの遺伝子多型がプリン代謝拮抗薬に与える影響に関しては、同一の臨床投与量を与えたときに、赤血球内のthioguanine nucleotidesの濃度が、野生型アレルの保有者と比較して、変異型アレルのヘテロ、ホモ保有者でそれぞれ、2倍、10倍程度に増加し、それに伴って、血液毒性の発生頻度が有意に高まることが知られている¹⁵⁾。また、レトロスペクティブな解析の結果、mercaptopurine治療において標準投与量が維持された期間が、野生型TPMTをホモで持つ患者においては、治療期間の84%を占めたのに対し、変異型アレルをヘテロ、ホモで有する患者では、65%、7%と低下したこと、また、TPMT活性と血球減少の副作用により使用を中止した期間との間に負の相関が見られることが報告されている¹⁶⁾。したがって、例えば、変異型アレルのホモの保有者は、通常の6~10%の投与量を用いるなど、TPMT遺伝子多型に合わせた投与量の至適化が提唱されている¹⁵⁾。

(3) dihydropyrimidine dehydrogenase(DPD)とフルオロウラシル系抗がん剤

5-fluorouracil (5-FU) は、ピリミジン代謝拮抗薬であり、乳がんや直腸がんによく用いられている。本薬物もプロドラッグであり、細胞内で5-fluoro-2-deoxyuridine monophosphate (5-FdUMP) がピリミジン合成に必須の酵素であるthymidylate synthase (TS) を阻害す

ることや、一部の3リン酸化体が、DNA, RNAに取り込まれて伸張抑制をすることで殺細胞活性を発揮している。一方、静脈内投与された5-FUのうち約85%は、肝臓中のDPDにより不活化されている。末梢単核球のDPD活性と5-FUの全身クリアランスには正の相関が認められることから、末梢単核球を用いてDPD活性の個人差を議論することが可能であり、その活性の個人差は、約20倍程度と推定されている¹⁷⁾。また、DPD活性の低い患者においては、活性体である5-FdUMP濃度の上昇とともに、致死的な消化器、血液ならびに神経毒性が発現することが知られている^{18,19)}。これまで、DPD活性の低い患者において、5-FU投与によるgrade 4の好中球減少のリスクが、通常より3.4倍高くなるとする報告²⁰⁾や、副作用発現開始までの期間が2倍短くなるとする報告²¹⁾が見られる。

近年起こったsorivudineと5-FUの相互作用による死亡事故は、sorivudineの腸内細菌による代謝物であるbromovinyl uracilによる非可逆的なDPDの不活化によるものであったこと²²⁾、また、DPD活性がほぼ欠損している患者において、5-FUの半減期が正常患者と比較して約10倍に遅延したこと¹⁹⁾を考慮すると、5-FUのクリアランスにおけるDPDの重要性は明らかである。現時点で、DPD遺伝子(DPYD)上の変異は、39箇所発見されており、大部分はDPD活性が欠損した患者より発見されたものであることから、機能欠損に関連する変異であるといえる。Caucasianでは、機能欠損した変異DPYDアレルをヘテロ、ホモで有する頻度は、それぞれ3~5%、0.1%程度である。中でもDPYD*2A (IVS14+1G>A) は、機能欠損を示すアレル中50%を占め、exon14のC末側のスプライドナー部位のmutationによりexon14がスキップされることで活性を持たない変異たんぱく質が産生されるものである^{18,23,24)}。臨床においても、DPYD*2変異をヘテロで有する患者において、5-FUのクリアランスが通常の2.5倍低下していたとする報告²⁵⁾や、5-FU投与によりgrade 3~4の重篤な副作用が出た患者60人を対象として、末梢単核球DPD活性ならびにDPYD*2変異の有無を調べたところ、DPD活性では、60%の患者において、通常の70%以下に活性が低下しており、うち44%についてはDPYD*2アレルを少なくとも1本有しているという報告がある²⁶⁾。一方、DPD活性が保持されている群では、ヘテロの患者1人のみであったことから、DPYD*2アレルがDPD活性低下ならびに毒性発現に影響する因子であることが示されている。しかしながら、DPD活性が低下している患者中

でもDPYD遺伝子中に変異が見つからないケースがあること²⁷⁾, DPYD*2の発現頻度に民族差が見られ、Caucasianでは、1~3%程度であるが、JapaneseやAfrican-Americanでは、現在までに見つかっていないことから、DPD活性を遺伝子変異からだけで説明できず²⁸⁾, 今後の検討が待たれる。また、5-FUの殺細胞活性と、腫瘍のDPD活性が必ずしも相関しないことから、5-FUの治療効果については、標的酵素であるTS遺伝子上流のエンハンサー領域の28塩基の繰り返し配列の回数も関与することが報告されており、薬力学的な遺伝子多型とセットで考えることで効果の個人差を良好に説明できるとされている²⁹⁾。

(4) UDP-glucuronosyltransferase (UGT)とirinotecan hydrochloride (CPT-11)

CPT-11は、topoisomerase I 阻害剤であり、進行性大腸がん特に効果を示すことから汎用されている。CPT-11はプロドラッグであり、投与後、一部はCYP3A4により不活性代謝物であるAPC, NPCに変換される一方、carboxylesterase-2により活性代謝物であるSN-38を生成する。その後、SN-38は、UGT1A1によりグルクロン酸抱合をうけ、SN-38 glucuronide (SN-38 Glu) となって不活化される。CPT-11は、優れた抗がん活性を示す一方、しばしば患者の一部で、用量規定毒性である致死的な消化管毒性（重篤な下痢など）や白血球減少が見られることが使用を困難にしている。したがって、SN-38の不活化に関わるUGT1A1の遺伝子多型は、SN-38の暴露量、ひいては毒性発現を変化させる要因として重要であろうと考えられる。実際、患者間でSN-38のグルクロン酸抱合活性には、50倍程度の差が観察されている³⁰⁾。UGT1A1の活性の個人差を説明する最も重要な変異としては、軽度のビリルビン上昇を伴うGilbert's syndromeにおいて見られるUGT1A1*28変異があげられる。UGT1A1のexon1前のプロモーター領域にあるTAの反復配列の繰り返し回数は通常6回 ((TA)₆TAA) であるのに対し、*28変異では、7回 ((TA)₇TAA) になっており、発現量が低下することが知られている³¹⁾。この配列は、TFIIDという転写因子が結合する場所であることから、*28において転写活性が低下していることが原因と考えられる。実際、UGT1A1の野生型アレルおよび*28変異アレルをそれぞれホモで持つヒトの肝ミクロソームを用いてin vitroでSN-38のグルクロン酸抱合活性を比較したところ、3.85倍の差が見られている³²⁾。また、臨床では、

表1 白血球減少(Grade 4)もしくは、下痢 (Grade 3以上)の副作用発現

	あり (n=26)	なし (n=92)	P
UGT1A1*28			<0.001
+/+	14 (54%)	79 (86%)	
+/-	8 (31%)	10 (11%)	
-/-	4 (15%)	3 (3%)	

UGT1A1*28アレルの保持、非保持を+、-で表した。

(Ando Y, et al, 2000³³⁾ より引用)

CPT-11投与中の患者20人中、3名に重篤な毒性が見られたが、全ての患者が*28変異アレルを少なくとも一つ保持しており³²⁾、また、好中球の最低数とUGT1A1の遺伝子型との間に相関が見られ、*28アレルが好中球の数を低下させる（すなわち毒性を上昇させる）ことが示唆される事例³²⁾や、CPT-11投与患者118人中重篤な毒性が26名に見られたが、毒性が見られた患者において、見られなかった患者と比較して、有意にUGT1A1*28アレル保持者が多かった事例が報告されている（表1）³³⁾。したがって、UGT1A1*28アレルは毒性発現の上昇に寄与していることが示唆される。UGT1A1*28のアレル頻度にも民族差が見られており、UGT1A1*28だけでは、すべてのSN-38の毒性発現を説明できないのが現状である。UGT1A1の他の変異として、TAの繰り返し回数が5, 8回の変異も見つかっており³⁴⁾、また、遺伝子内のアミノ酸変異を伴ういくつかの変異も、Gilbert's syndromeを引き起こすことが知られており、これらもSN-38のグルクロン酸抱合活性を変えうる要因になることが今後予想される。

(5) N-acetyltransferase 2 (NAT2)とamonafile

Amonafideは、DNAのインターカレート活性とtopoisomerase II 阻害剤として働き、乳がんや白血病治療薬として開発されていた。本薬物は既に開発が中止されている薬剤であるが、治験のPhase I の段階で代謝酵素の遺伝子多型を考えた投与量の層別化がなされていた珍しい事例として紹介する³⁵⁾。Amonafideは、NAT2により活性を有する代謝物であるN-acetyl-amonafileとなる一方、CYP1A2により活性を持たないN'-oxide-amonafileへと変換される。NAT2の酵素活性には、抗結核薬であるisoniazideの個体差に関連することが知られており、NAT2活性の低いslow acetylatorの存在が知られていた。NAT2活性は、カフェイン摂取後の尿中のアセチル化体と非アセチル化体の比を取ることであり、fast, slow acetylatorを区別している。同一量の

amonafileの投与で、fast acetylatorの方が、slow acetylatorと比較して、骨髄毒性の発現を示しやすいことやamonafileのAUCが大きいことから、Phase I 試験では、fast, slow acetylatorの投与量を、250, 375 mg/m²に設定して行うことで、ほぼ同じamonafileの血中AUCを得ることに成功している³⁵⁾。fast acetylatorでamonafileのクリアランスが低下する原因については、生成されたN-acetyl-amonafileが、CYP1A2による代謝経路を阻害するためであると考えられている。さらに、PDモデルの構築により、NAT2の活性に加え、白血球数と性別を考慮することでよりamonafileの個別化投与設計が可能であることが示唆されており、このように、あらかじめ特定の分子の遺伝子型や表現型（酵素活性など）に応じて層別化された臨床試験を行うことにより、できるだけ多くのヒトに対して効果を最大限発揮させ、かつ副作用の少ない投与方法を実証するような試験が今後組まれることが期待される。

(6) glutathione-S-transferase (GST)

GSTは、様々な異物をグルタチオン抱合することで水溶性を上げ排出を促す酵素として機能しており、GSTA1, GSTP1, GSTM1, GSTT1, GSTZ1の5種類のサブタイプが存在している。抗がん剤の代謝との関連では、GSTP1がoxaliplatinなど白金製剤やアルキル化剤であるcyclophosphamideの活性代謝物の不活化に、また、GSTM1, GSTA1は、アルキル化剤busulfanの不活化に寄与している。GSTP1の遺伝子変異としてCaucasianで頻度の高いもの(33%)に、Ile105Valの変異があり、酵素活性が低下することがin vitro実験で実証されている³⁶⁾。240名のcyclophosphamide治療を受けている患者を対象として、前述のGSTP1の変異で層別化を試み、生存率を比較したところ、Val変異アレルをホモで保持する患者群について、Ile型アレルをホモで保持する患者と比較して、有意に死亡リスクの低下が見られた³⁷⁾。また、進行性大腸がん治療のため、5-FUとoxaliplatinの併用療法を受ける患者107名を対象として、先の変異により層別化をして、生存期間の中央値を比較したところ、Ile型アレルをホモで保持する患者では、7.9カ月であったのに対し、Val変異アレルをホモで保持する患者では、24.9カ月であることが示された³⁸⁾。これらのことは、cyclophosphamideの活性代謝物やoxaliplatinの暴露の多いほうが効果的な治療効果を生み出すことを意味しているといえる。さらに毒性との関連では、骨髄移植に伴う合併症である冠動脈閉鎖症(HVOD)は、

busulfanなどの毒性により引き起こされる場合があることが知られており、114名の移植患者を対象として、HVODの発症を観察したところ、GSTM1の活性欠損を示す遺伝子型において、有意にHVODの発症率が高いという結果を得、さらにbusulfanのクリアランスが上昇していることが明らかとされている³⁸⁾。この現象は、GSTM1の活性欠損により、busulfanの代謝の主要な寄与を占めるGSTA1の発現が2~4倍上昇することが知られており、そのためクリアランスが上昇したと考えられ、毒性発現には、おそらくbusulfanの代謝物の毒性と、機能上昇によるGSHの枯渇が原因になると推測されている³⁸⁾。

(7) CYP (cytochrome P450)

肝臓より消失する薬物の多くは、肝臓内に主に発現するCYPにより水溶性が高まる傾向の構造に変換され、排泄される。CYPの遺伝子多型については、これまで多くのin vitroおよび臨床研究が行われており、機能解析が進められてきた。一般薬では、CYP2C19の遺伝子多型とプロトンポンプ阻害剤の血中濃度、効果およびH.pylori除菌率との関連³⁹⁾や、CYP2D6の遺伝子多型と降圧薬デブリンソキンの血中濃度との関連⁴⁰⁾など非常に数多くの事例が報告されている。抗がん剤の多くもCYPによる代謝を受け、活性化および不活化されることが知られているが、薬物の代謝経路が複数存在し、1つの酵素の機能変化が血中濃度推移全体に与える影響が観察しにくいことや、副作用が致死的であるため、遺伝子多型による層別化試験が実施しにくいことなどにより、あまり臨床における事例は報告されていないのが現状である。cyclophosphamideは、アルキル化剤として抗がん治療に用いられるが、一方で、ループス腎炎の治療においても間欠的静注療法が取られる。そこで、CYPの遺伝子多型と腎疾患への効果、副作用(早期閉経など)との関連が62名の患者を用いて調べられている。その結果、CYP2C19*2 (G681A, スプライシング異常を引き起こす)を有する患者について、早期閉経のリスクが有意に減少、さらにCYP2C19*2, CYP2B6*5 (C1459T, 発現量低下を示す)をそれぞれホモで有する患者について、腎疾患の悪化が促進される傾向が示された⁴¹⁾。cyclophosphamideの活性化には、CYPによる4-hydroxylationが必須で、この過程には、種々のCYPが関与することが示唆されており、今回の結果は、この活性化の減少が薬効・副作用の低下につながったものと考えられている。また、Tegafurは、

CYP2A6により活性化されて5-FUに変換され抗がん活性を示すプロドラッグである。最近、tegafurと5-chloro-2,4-dihydropyridine (DPD inhibitor) の合剤であるTS-1を服用した消化器がん患者中で有意に高い血中濃度を示した1患者について、CYP2A6*4C (全遺伝子欠損) と*11 (in vitroでVmax値が野生型の半分) の変異を有していることがわかり、これらがtegafurの活性化の低下をきたしていることが明らかになった⁴²⁾。また、in vitroでの検証であるが、paclitaxelの不活性化に寄与するCYP2C8の*3多型は、Caucasianで13%のアレル頻度であり、paclitaxelの代謝活性をまったく示さないことが明らかとされており、今後臨床での意義付けがなされるものと思われる⁴³⁾。

(8) 薬物トランスポーター

近年、小腸での吸収過程、肝臓・腎臓などにおける薬物の体内からの消失過程、また、血液脳関門・血液脳脊髄液関門など、重要な組織への薬物の分布を制限する機構において、膜上に存在する種々の薬物トランスポーターによる効率よい取り込み・排泄の重要性が明らかにされてきた。特にATPの加水分解によるエネルギーを駆動力とする排出トランスポーター (ABC transporter) は、もともとがん細胞の多剤耐性獲得の分子機構として明らかにされてきたものであり、種々の抗がん剤を基質とすることが知られている。代表的なABCトランスポーターとしては、MDR1 (multidrug resistance 1) や、MRP (multidrug resistance associated protein) ファミリーのトランスポーター、BCRP (breast cancer resistance protein) などがあげられる。いずれも基質認識性は広範であり、トランスポーター間でオーバーラップも見受けられる。詳細は、他の総説を参照されたい⁴⁴⁾ ⁴⁵⁾。排出トランスポーターのがん細胞における発現は、個々のがんにより異なっており、マイクロアレイなどを用いたがんの個性診断が進められているのが現状である。また、BCRPにおいては、がん特有に見られる482位のアミノ酸変異によって薬物の種類依存的に、輸送機能・薬剤耐性に変化が見られることが知られており、adriamycin耐性はR482G or Tの変異型でしかみられないのに対し、methotrexateの輸送は、逆に野生型 (R482) でしか見られず、一方、mitoxantrone耐性は、すべての型で見られるということが報告されている⁴⁶⁾ ⁴⁷⁾。これらは、健常人のSNPsとしては見られないことから、抗がん剤の効果を考える上で、がん特有の遺伝子変化にも気を配る必要があることを示唆し

ている。

一方、前述のとおり、全身に発現するトランスポーターは、抗がん剤の薬物動態の決定因子としても重要である。特に抗がん剤のように安全域の狭い薬物においては、小さな血中濃度の変化が、薬効や副作用に大きな影響をもたらすことが予想され、トランスポーターの遺伝子変異による機能変化は、治療効果を変える一因になりうる。最近、トランスポーターについてもSNPs解析が進められ、一部のSNPsについては、in vitroによる解析やヒト臨床研究により、機能変化が認められている。例えば、肝取り込みトランスポーターであり、広範な有機アニオン化合物を基質にするOATP (organic anion transporting polypeptide) 1B1については、日本人で約15%の頻度を示す*15 (Asn130Asp, Val174Ala) アレル保持者において、HMG-CoA還元酵素阻害薬であるpravastatinの血中AUCが有意に上昇することが示されており⁴⁸⁾、in vitroの解析からも、*15変異体発現細胞において、単位蛋白量あたりのVmax値の低下が認められている⁴⁹⁾。また、*15多型では、SN-38の輸送能力も低下することがin vitro実験で示されていることから、CPT-11の効果・副作用との関連が考えられる⁵⁰⁾。MDR1では、アミノ酸変化を伴わない変異 (C3435T) を持つ人で、digoxin経口投与後の血中濃度が高くなるという現象が見出されており⁵¹⁾、その後様々な臨床研究が行われているが、機能変化について一致した見解が得られていないのが現状である⁵²⁾。また、BCRPについては、diflomotecanの血中AUCが、Gln141Lys変異を有する患者において有意に上昇することが明らかとなっている (図3)⁵³⁾。一方、in vitroの解析により、変異型蛋白のアデノウイルス発現系において、単位ウイルスあたりの発現が野生型と比べて低いが、単位蛋白あたりの活性は複数の基質で変わらないことが示されている⁵⁴⁾。さらに、胎盤におけるBCRPの発現を調べたところ、Gln141Lys変異型の発現は野生型と比べて有意に低下していることが明らかにされている⁵⁵⁾。したがって、BCRPが小腸の管腔側ならびに肝臓の胆管側に発現していることを考えると、diflomotecanの血中濃度の変化は、BCRPによる発現低下による吸収の抑制・胆汁排泄の促進効果の減少で説明可能である。トランスポーターの多くは、種々の抗がん剤を基質とすることを考えると、今後、抗がん剤の効果とトランスポーターの遺伝子変異の関係についてもさらに明らかにされることが期待される。

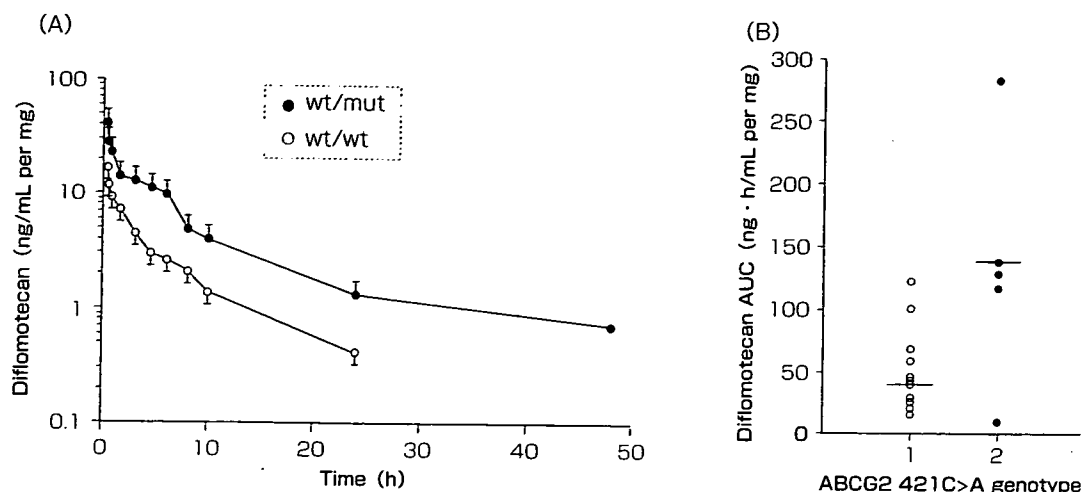


図3 BCRP(ABCG2)のC421A遺伝子変異がdiflomotecanの血中濃度に与える影響

- (A) C421A保持, 非保持者におけるdiflomotecan静脈内投与後の血漿中濃度推移.
421位がC, Aのアレルをそれぞれ, wt, mutとあらわしている.
(B) C421A保持, 非保持者におけるdiflomotecan静脈内投与後の血漿中AUCは, wt/wt, 2は, wt/mutのヒトをあらわしている.

(Sparreboom A, et al,2004⁵³) より改変引用)

(9) 最後に

以上, 薬物代謝酵素・トランスポーターにおける遺伝子変異が抗がん剤の薬物動態に与える影響について, 現在の知見を概説した. 抗がん剤の効果や副作用発現には, 大きな個人差が見られるが, その原因は, 全身の血中濃度を規定する因子, がん細胞や副作用臓器における薬物の集積を規定する因子ならびに薬物の標的因子のそれぞれの個人差の総体としてとらえることができる. 現在では, 多種類の標的SNPsを網羅的に同定可能なSNPチップの開発も進んでおり, すべての

因子の代表的なSNPsを簡便に検査することができる日もそう遠くないと思われる. そのためにも, 現段階では, 抗がん剤の効果の規定する因子のさらなる同定と変異による機能変化の実証を進めていく必要があると思われる. そのためには, 健常人での抗がん剤を用いた臨床研究が困難であることを考慮すると, 各蛋白の機能を予測しうるプローブ薬の開発ならびに, 変異蛋白発現細胞などin vitro実験において見られた機能変化からin vivoにおける薬物動態を予測する方法論など基盤作りも同時に行っていく必要があると思われる.

文 献

- Weinshilboum RM, Sladek SL : Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980, 32, 651-62
- Krynetski EY, Tai HL, Yates CR, et al. : Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: clinical importance and molecular mechanisms. *Pharmacogenetics* 1996, 6, 279-90
- Tai HL, Fessing MY, Bonten EJ, et al. : Enhanced proteasomal degradation of mutant human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) in mammalian cells: mechanism for TPMT protein deficiency inherited by TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B or TPMT*3C. *Pharmacogenetics* 1999, 9, 641-50
- Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, et al. : Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94, 6444-9
- Collie-Duguid ES, Pritchard SC, Powrie RH, et al. : The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics* 1999, 9, 37-42
- McLeod HL, Pritchard SC, Githang'a J, et al. : Ethnic differences in thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: evidence for allele specificity in Caucasian and Kenyan individuals. *Pharmacogenetics* 1999, 9, 773-6
- Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, et al. : Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 1997, 62, 60-73
- Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, et al. : Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 1997, 126, 608-14
- Hiratsuka M, Inoue T, Omori F, et al. : Genetic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism in a Japanese population. *Mutat Res* 2000, 448, 91-5
- Yan L, Zhang S, Eiff B, et al. : Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. *Clin Pharmacol Ther* 2000, 68, 210-9
- McLeod HL, Relling MV, Liu Q, et al. : Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995, 85, 1897-902
- Szumlanski CL, Honchel R, Scott MC, et al. : Human liver thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: biochemical properties, liver-erythrocyte correlation and presence of isozymes. *Pharmacogenetics* 1992, 2, 148-59
- Woodson LC, Dunnette JH, Weinshilboum RM : Pharmacogenetics of human thiopurine methyltransferase: kidney-erythrocyte correlation and

- immunotitration studies. *J Pharmacol Exp Ther* 1982, 222, 174-81
- 14) Evans WE : Pharmacogenetics of thiopurine S-methyltransferase and thiopurine therapy. *Ther Drug Monit* 2004, 26, 186-91
- 15) Evans WE : Thiopurine S-methyltransferase: a genetic polymorphism that affects a small number of drugs in a big way. *Pharmacogenetics* 2002, 12, 421-3
- 16) Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, et al. : Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91, 2001-8
- 17) Fleming RA, Milano G, Thyss A, et al. : Correlation between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral mononuclear cells and systemic clearance of fluorouracil in cancer patients. *Cancer Res* 1992, 52, 2899-902
- 18) Wei X, McLeod HL, McMurry J, et al. : Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *J Clin Invest* 1996, 98, 610-5
- 19) Diasio RB, Beavers TL, Carpenter JT : Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. *J Clin Invest* 1988, 81, 47-51
- 20) Van Kuilenburg AB, Meinsma R, Zoetekouw L, et al. : Increased risk of grade IV neutropenia after administration of 5-fluorouracil due to a dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: high prevalence of the IVS14+1g>a mutation. *Int J Cancer* 2002, 101, 253-8
- 21) van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel, DJ, et al. : Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clin Cancer Res* 2000, 6, 4705-12
- 22) Okuda H, Ogura, K, Kato, A, et al. : A possible mechanism of eighteen patient deaths caused by interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1998, 287, 791-9
- 23) Johnson MR, Hageboutros A, Wang, K, et al. : Life-threatening toxicity in a dihydropyrimidine dehydrogenase-deficient patient after treatment with topical 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1999, 5, 2006-11
- 24) van Kuilenburg, A. B., Muller, E. W., Haasjes, J., et al. Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clin Cancer Res* 2001, 7, 1149-53
- 25) Maring JG, van Kuilenburg AB, Haasjes J, et al. : Reduced 5-FU clearance in a patient with low DPD activity due to heterozygosity for a mutant allele of the DPYD gene. *Br J Cancer* 2002, 86, 1028-33
- 26) Van Kuilenburg AB, Meinsma R, Zoetekouw L, et al. : High prevalence of the IVS14 + 1G>A mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene of patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity. *Pharmacogenetics* 2002, 12, 555-8
- 27) Collie-Duguid ES, Etienne MC, Milano G, et al. : Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics* 2000, 10, 217-23
- 28) Wei X, Elizond, G, Sapone A., et al. : Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Genomics* 1998, 51, 391-400
- 29) Relling MV, Dervieux T : Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2001, 1, 99-108
- 30) Fisher MB, Vandenbranden M, Findlay K, et al. : Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity: relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank. *Pharmacogenetics* 2000, 10, 727-39
- 31) Bosma PJ, Chowdhury JR., Bakker C, et al. : The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995, 333, 1171-5
- 32) Iyer L, Das S, Janisch L, et al. : UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J* 2002, 2, 43-7
- 33) Ando Y, Saka H, Ando M, et al. : Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* 2000, 60, 6921-6
- 34) Beutler E, Gelbart T, Demina A : Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95, 8170-4
- 35) Ratain MJ, Mic, R, Berezin F, et al. : Phase I study of amonafide dosing based on acetylator phenotype. *Cancer Res* 1993, 53, 2304-8
- 36) Watson MA, Stewart RK, Smith GB, et al. : Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 1998, 19, 275-80
- 37) Sweeney C, McClure GY, Fares MY, et al. : Association between survival after treatment for breast cancer and glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism. *Cancer Res* 2000, 60, 5621-4
- 38) Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, et al. : Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002, 94, 936-42
- 39) Furuta T, Takashima M, Shirai N, et al. : Cure of refractory duodenal ulcer and infection caused by *Helicobacter pylori* by high doses of omeprazole and amoxicillin in a homozygous CYP2C19 extensive metabolizer patient. *Clin Pharmacol Ther* 2000, 67, 684-9
- 40) Dalen P, Dahl ML, Eichelbaum M, et al. : Disposition of debrisoquine in Caucasians with different CYP2D6-genotypes including those with multiple genes. *Pharmacogenetics* 1999, 9, 697-706
- 41) Takada K, Arefayene M, Desta Z, et al. : Cytochrome P450 pharmacogenetics as a predictor of toxicity and clinical response to pulse cyclophosphamide in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2004, 50, 2202-10
- 42) Daigo S, Takahashi Y, Fujieda M, et al. : A novel mutant allele of the CYP2A6 gene (CYP2A6*11) found in a cancer patient who showed poor metabolic phenotype towards tegafur. *Pharmacogenetics* 2002, 12, 299-306
- 43) Dai D, Zeldin D C, Blaisdell JA, et al. : Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics* 2001, 11, 597-607
- 44) Doyle LA, Ross DD : Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 2003, 22, 7340-58
- 45) Kruh GD, Belinsky MG : The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 2003, 22, 7537-52
- 46) Volk EL, Schneider E : Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res* 2003, 63, 5538-43
- 47) Honjo Y, Hrycyna CA, Yan QW, et al. : Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res* 2001, 61, 6635-9
- 48) Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, et al. : Polymorphisms of OATP-C (SLC22A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2003, 73, 554-65
- 49) Iwai M, Suzuki H, Ieiri I, et al. : Functional analysis of single nucleotide polymorphisms of hepatic organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C). *Pharmacogenetics* 2004, 14, 749-57
- 50) Nozawa T, Minami H, Sugiura S, et al. : Role of Organic Anion Transporter Oatp1b1 (Oatp-C) in Hepatic Uptake of Irinotecan and Its Active Metabolite Sn-38: In Vitro Evidence and Effect of Single Nucleotide Polymorphisms. *Drug Metab Dispos* 2004,
- 51) 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 U S A* 2000, 97, 3473-8
- 52) Marzolini C, Paus E, Buclin T, et al. : Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004, 75, 13-33
- 53) Sparreboom A., Gelderblom H, Marsh S, et al. : Diflomotecan pharmacokinetics in relation to ABCG2 421C>A genotype. *Clin Pharmacol Ther* 2004, 76, 38-44
- 54) Kondo C, Suzuki H, Itoda M, et al. : Functional analysis of SNPs variants of BCRP/ABCG2. *Pharm Res* 2004, 21, 1895-903
- 55) Kobayashi D, Ieiri I, Hirota T, et al. : Functional assessment of abcg2 (bcrp) gene polymorphisms to protein expression in human placenta. *Drug Metab Dispos* 2005, 33, 94-101

予防医学 事典

松島綱治
酒井敏行
石川 昌
稲寺秀邦
……[編集]……

朝倉書店

97 解毒・排出系の遺伝子多型

3) 副作用の予知：トキシコゲノミクス

創薬の現場において前臨床および臨床開発の段階で数多くの開発候補化合物がドロップアウトすることは憂慮すべき重大な問題である。開発中止のケースの約50%は薬物動態の不具合と毒性に起因する。トキシコゲノミクスのめざすところは、毒作用の分子機序の理解とヒトで起こりうる毒作用（副作用）の予測性を高めることにある。トキシコゲノミクスは、DNAチップなどを用いて遺伝子発現パターンを同定/定量化し、毒作用発現機序を明確にしていく研究方法である。毒性発現機序の解明にあたっては、ゲノミクスとバイオインフォマティクスの技術を融合させ、遺伝子発現のパターンを確証しながらデータベースを構築していき、最終的には毒性予測を可能にする。

4) 遺伝子多型と薬剤応答性の個人差：ファーマコゲノミクス

薬剤応答性に個人差が存在するが、薬剤応答性の差は、薬剤ターゲット分子（レセプター、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、薬剤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。ファーマコゲノミクスは薬剤応答性の多様性を説明し、その基礎にある遺伝的背景を探求する研究分野である。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り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、一塩基多型（single nucleotide polymorphism: SNP）はヒトゲノムにおいて平均して約1,000 bpごとに1個の頻度で存在し、疾患原因や薬剤応答性との関連情報を得る上で有効な情報源となる。

参考文献

- 1) 野口照久, 石井威望: 21世紀の創薬科学. 共立出版, 東京, 1998.
- 2) 石川智久, 堀江透: 創薬サイエンスのすすめ. 共立出版, 東京, 2002.
- 3) Kalow W, Meyer UA, Tyndale RF 著, 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. テクノミック, 東京, 2002.
- 4) 石川智久: ゲノム創薬と未来産業. エルゼビア・ジャパン, 東京, 2003.

1. 組織細胞の異物解毒・排出にかかわる因子

解毒排出系の分子の機能変化は、ホルモンなど内因性物質の濃度調節や、環境・食物から摂取する毒性物質の排除のみならず、種々の薬物の体内動態を変動させる要因としても重要である。旧来より、同一の投与量の薬物を患者に投与しても、その血中濃度推移や効果には個人差が認められることが経験的に知られており、一卵性双生児の血中濃度の比較や、血中濃度のヒストグラムの多峰性から、遺伝的要因が示唆されてきた。現在では、いくつかの事例については、遺伝子多型から個人差が説明可能になりつつある。これらの情報は、医療現場において、患者の遺伝子情報をもとにした最適な薬物の選択や投与設計といった個別化薬物治療への利用や、新薬開発時にあらかじめ被験者の遺伝的背景を考慮した層別化試験を行うことで効率よい治験を進める上で、きわめて有用であると考えられる。

解毒排出系分子の発現は、おもに、肝臓や腎臓など体内からの異物排出に関与する臓器と、脳、生殖器など特に重要な器官の局所的な保護に働く、物質の移行を制限する関門（血液脳関門、血液胎盤関門など）にみられる。ただし、発現する分子種は、両ケースでかなりオーバーラップがみられる。機能面からの分類としては、①血中から臓器細胞への取込みに関与するトランスポーター、②細胞内でも酸化反応など種々の物質変換にかかわる cytochrome P-450 (CYP)、③グルクロン酸、グルタチオン、硫酸基など種々の水溶性を高める官能基を付加する抱合酵素、④CYP以外の物質変換にかかわる酵素、⑤細胞内からの排出を担うトランスポーターなどに大別される。本項ではこれら各過程にかかわる遺伝子多型に関する現在の知見を概説する。

2. CYPの遺伝子多型

解毒排出系分子のなかでは、いち早く遺伝子多型解析と体内動態の個体差の相関研究が行われた領域であり、臨床的にも多くの事例が集積している。

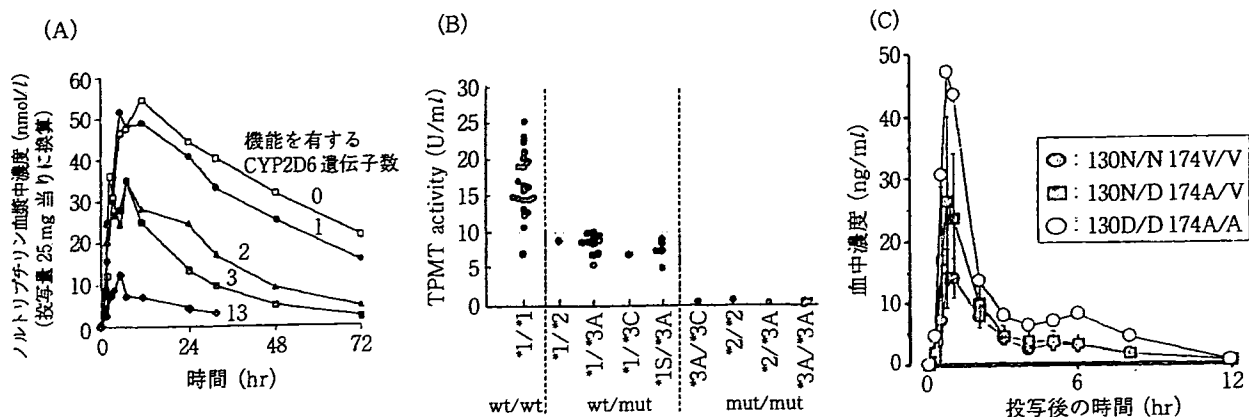


図 解毒排出系に関する分子の遺伝子多型と薬物動態の相関の例
 (A) CYP2D6 の遺伝子多型とノルトリプチリンの血中濃度推移との関連⁵⁾
 (B) TPMT の遺伝子多型と TPMT 活性の相関⁶⁾
 (C) OATP1B1 遺伝子多型とプラバスタチン血中濃度推移との関連⁷⁾

多型の命名法に関しても体系化されている (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>).

2D6 の遺伝子多型は、子宮収縮薬 sparteine と降圧薬 debrisoquine の両方で代謝物の排泄量に二峰性が認められ、両方の代謝能力が個々で相関するという臨床事象から見出された。現在では数多くの多型が同定されており、酵素欠損、機能低下や、遺伝子重複による機能亢進もみられている。2D6 の基質薬物は、 β 遮断薬 propranolol・metoprolol、抗うつ薬 nortriptyline・fluoxetine、鎮咳薬 codeine など、比較的治療域が狭い薬物が多く、2D6 多型診断は臨床での投与設計において有用な情報を与えると考えられる (図 A)。2C19 においては、胃十二指腸潰瘍の治療戦略の 1 つとして *H. pylori* 除菌時に併用されるプロトンポンプ阻害剤 omeprazole の代謝能力が、2C19 の蛋白欠損変異 (*2, *3) の保持者において有意に低下しており、さらに薬効を反映した胃内 pH の低下、amoxicillin 併用時の除菌率とも相関することが知られている。他には催眠鎮静薬 diazepam や抗うつ薬 imipramine など数種の薬物で 2C19 多型と薬物動態との相関が報告されている。2C9 では、phenytoin, warfarin, 糖尿病薬 glipizide の薬物動態、薬効・副作用と活性低下を引き起こす *3 変異との明確な相関が報告されている。しかし中には、遺伝子型と表現系の不一致がみられるケースも報告されている。たとえば、同じ 2C9 で代謝される diclofenac の血中濃度推移に *3 変異は影響を与えず、基質により変異の影響が異なる事例や、また、2C19 などで遺伝子型はヘテロ欠損型であるにもかかわらず、薬物動態はホモ欠損型と同様の挙動を示すといったいわゆる phenocopy 現象

がみられる事例があり、遺伝子型の診断だけでは不十分であるケースがあることも念頭に入れておく必要がある。また、アルコール依存症患者の 2E1 誘導や、喫煙者の 1A2 の誘導などイントロンや 5' 上流域の多型に起因して特殊な環境下での誘導の程度が異なる事例や、最近では、nicotine 代謝を司る 2A6 の欠損型変異をもつヒトでは喫煙頻度や肺癌のリスクが低いとする報告や、3A4 多型と前立腺癌、白血病発症との関連に関する報告もあり、病気のリスクとの関連も興味深い。

3. 抱合酵素の遺伝子多型

抗結核薬 isoniazid の *N*-アセチル化代謝活性の個人差は旧来より知られており、現在では、その大部分が NAT2 (*N*-acetyltransferase 2) の多型で説明可能であることが明らかとされている。通常は加水分解産物の hydrazine が NAT2 によりすみやかにアセチル化され解毒されるが、変異 NAT2 の活性低下による hydrazine の蓄積により肝障害が発現することが知られている。また procainamide, sulfasalazine の代謝能力、および、副作用である全身性エリテマトーデスの発症と、NAT2 変異との相関も認められている。グルクロン酸抱合酵素である UGT (UDP-glucuronosyltransferase) の遺伝子変異は、高ビリルビン血症を示す Crigler-Najjar および Gilbert 症候群の解析から多数同定されてきた。抗癌剤 CPT-11 の活性代謝物 SN-38 は、UGT1A1 により抱合されるが、UGT1A1 プロモーター領域の TA リピートが野生型より 1~2 回多い変異では転写活性が半分に低下するという報告があり、SN-38 の消失遅延につながる可能性が考えられる。また UGT1A1 は、ステロイドホルモ

ンの抱合にもかわり、変異と乳癌発症率との相関も示唆されている。グルタチオン抱合酵素 GST (glutathione S-transferase) や、硫酸抱合酵素 SULT (sulfotransferase) の遺伝子多型については、薬物動態に関する事例は少なく、癌原物質やステロイド化合物の抱合活性や癌感受性との相関研究も統一した見解が得られていないのが現状である。

4. そのほかの代謝酵素の遺伝子多型

TPMT (thiopurine S-methyltransferase) に関しては、プリン代謝拮抗薬 6-mercaptopurine の活性本体である 6-thioguanine nucleotides の不活化を担う酵素であるが、遺伝子多型と酵素活性に明確な相関が認められており、骨髄抑制など重篤な副作用回避のためには、TPMT の遺伝子検査を事前に行い、投与量を調節する必要性が提唱されている (図 B)。また、DPD (dihydropyrimidine dehydrogenase) は、5-FU の代謝律速酵素であるが、この欠損多型と 5-FU の副作用の相関も認められている。

5. トランスポーターの遺伝子多型

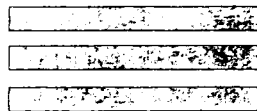
細胞膜上には、非常に多様なトランスポーターが発現しており、脂質膜の透過が困難な物質の濃縮的な取込み・排泄に関与していることが知られてきた。たとえば有機アニオン系化合物の細胞内への取込みは OATP (organic anion transporting polypeptide) や OAT (organic anion transporter) ファミリーが、排出には ATP 加水分解を駆動力として機能する一連の ABC (ATP binding cassette) トランスポーターがおもに関与する。トランスポーター遺伝子変異による機能欠損で引き起こされる病態は、胆汁うっ滞を主症状とする Dubin-Johnson syndrome (multidrug resistance associated protein 2: MRP2) や PFIC (primary familial intrahepatic cholestasis) (bile salt export pump: BSEP) など多数知られているが、健常人における遺伝子多型と薬物動態の個人差の関連に関しては限られた事例しか報告がないのが現状である。おもに中性・カチオン性化合物を基質とし肝臓や小腸、血液脳関門などで排出輸送を担う P 糖蛋白 (multidrug resistance 1: P-gp/MDR1) の遺伝子多型と digoxin の消化管吸収の個人差に関する報告では、興味深いことにアミノ酸変異を伴わない高頻度の変異 (C3435T) が、MDR1 の十二指腸の発現量減少、経口投与 digoxin の AUC 増加を引き起こすことが報告された。現在では多くの臨床研究の結果が集積しつつあるが、同一基質を用いた研究ですら互いに矛盾する結果もあり、結論には至っていない。一方、ハプロタイ

プ解析から、別の 2 ヶ所の変異 (G2677 (T, A), C1236T) と高頻度にリンクすることが明らかとなり、連鎖不平衡解析から未知の変異とのリンクの可能性も示唆されている。OATP1B1 (OATP-C/OATP2) は、肝臓血管側に特異的に発現する取込みトランスポーターであり、きわめて広範な有機アニオンを基質とすることから、多くの薬物の体内動態に大きな影響をもつことが推察されている。最近、OATP1B1 について多くの SNPs が同定され、うち一部が *in vitro* において機能解析が進められている。一方、臨床においても、OATP1B1*15 多型 (N130D, V174A) を保持する日本人において、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 pravastatin の血漿中 AUC が野生型と比較して有意に上昇する事例 (図 C) や、海外においても、OATP1B1*5 (V174A), *1b (N130D) の保持者について、pravastatin の血漿中 AUC の上昇、低下が見られることが明らかとされた。また、薬効である血清コレステロール値の変化割合も *5 変異で有意に低下することや、重篤な副作用である横紋筋融解症の初期指標となる creatine phosphokinase (CPK) 上昇が起こった患者群について有意に *15 多型が見られる報告がされており、トランスポーターの遺伝子多型が薬効・副作用にも影響を与えることが示唆され、今後多くの事例の集積が待たれる。

参考文献

- 1) 澤田康文編：薬物動態・作用と遺伝子多型。医薬ジャーナル社、大阪、2001。
- 2) Kalow W, Meyer UA, Tyndale RF 編、石川智久監訳：ファーマコゲノミクス、テクニク、東京、2002。
- 3) 日本薬学会(杉山雄一)編：次世代ゲノム創薬。中山書店、東京、2003。
- 4) Lee VHL ed: Pharmacogenetics of CYP enzymes and drug transporters. In: Advanced Drug Delivery Reviews, 54 (10), Elsevier, Ireland, 2002.
- 5) Dalen P, et al: *Clin Pharmacol Ther* 63 (4): 444-452, 1998.
- 6) Yates CR, et al: *Ann Intern Med* 126: 608, 1997.
- 7) Nishizato Y, et al: *Clin Pharmacol Ther* 73: 554-565, 2003.

2



前臨床から臨床試験 へのブリッジング

杉山 雄一 (東京大学大学院薬学系研究科医薬品評価科学講座/
分子薬物動態学教室教授)

前田 和哉 (東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室助手)

はじめに

近年、リード化合物の発見およびリード化合物の最適化のための combinatorial chemistry (CC) と high throughput screening (HTS) の手法の急速な発展により、新薬創製のプロセスが大きく変化している。基礎薬科学の発展を支柱として、21世紀の創薬は、最初に分子標的を決め、それによくフィットする薬をできるだけ短時間で選択し開発するという、より strategic なものになっていくことは間違いない。また、薬物の反応性(効果, 副作用)と患者の遺伝的背景の関連性が解明され始めているが、その関連が明確にされたものは、まだごく一部にすぎない。薬理遺伝学試験が臨床試験に与える大きな影響の一つとしては、他の章に詳細に述べられているように、上市薬剤の国際的承認のスピードアップがあげられる。人種による遺伝子変異の頻度差を考慮して、薬剤が遺伝子変異による機能・発現変化を受けにくい酵素により代謝、輸送されることを示した、酵素・トランスポーターのマッピングデータは、各集団における試験規模を縮小する合理的な理由になる。これら遺伝子多型に関する情報の必要性は、代謝酵素・トランスポーターのみならず、さらには薬効、副作用のターゲットになる各種タンパクについてもいえることであり、これら情報が十分に集まれば、医薬品開発に必要な膨大な動物実験と、繰り返し行われる臨床試験の規模・数を大幅に減らすことができるようになるものと期待される。このような背景の下、ヒトにおける薬剤反応性(薬効, 副作用)の予測は、医薬品開発の迅速化と効率の上昇にとって不可欠の事柄である。この予測を可能にするためには、薬物の血中濃度推移の予測、ターゲット部位における濃度推移、暴露量の予測が必要になることは論を待たない(図2-1)。本章においては、ヒト組織、遺伝子発現系を用いて代謝酵素活性、トランスポート活性を測定することにより、動態特性の最適化、副作用の軽減が可能になった実例を我々の研究を中心に紹介しながら、前臨床試験と臨床試験のブリッジングの方法について議論したい。

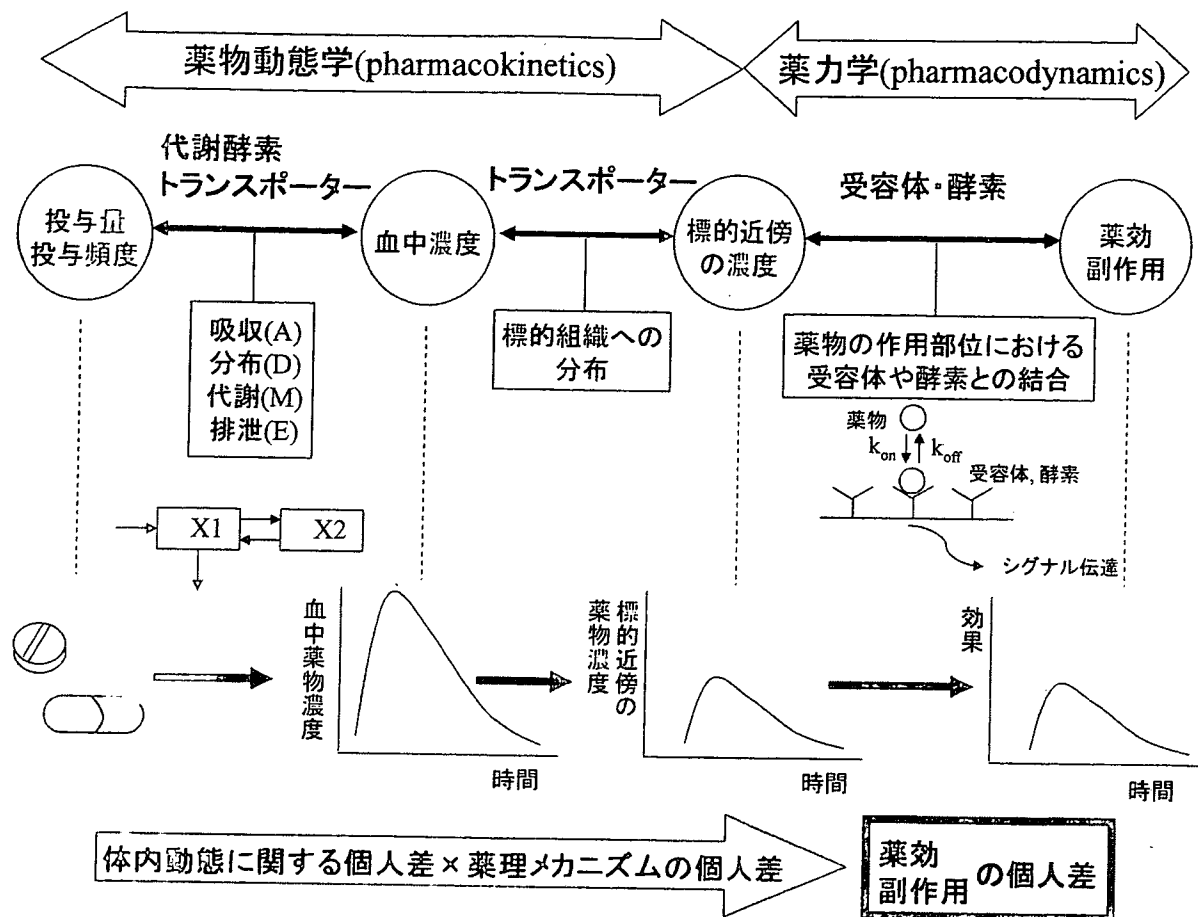


図 2-1 薬物の効果・副作用の個人差を決定付ける要因

(文献 11) より改変して引用)

薬物動態領域においては、近年の進歩により、吸収 (A)、分布 (D)、代謝 (M)、排泄 (E) の個々の特性のスクリーニング系が確立されつつある。今後必要とされることは、これら複数の動態特性の情報から薬効・副作用組織における薬物暴露を予測する方法論、さらには、これら薬物動態の情報を、薬効・副作用分子をターゲットにして行った薬理スクリーニングの情報と統合するための方法論の開発である。例えば、ADME の各特性をそれぞれのスクリーニング系で測定し、既に測定されている薬効・副作用分子に対するスクリーニングから得られた特性値の情報と合わせて、臨床試験にあげる候補品を選択する時に、すべての特性値において最も優れた化合物はほとんど考えられないため、何らかの選択法が必要となるが、残念ながら現状は、この選択の過程が非科学的であるといわざるを得ない。最優先されるべき薬を科学的に選択するには、pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) モデルをもとに、定量的な考察をすることが不可欠となる^{1,2)} (図 2-2)。こうした方法論に将来、化合物の化学構造から ADME の個々の特性を予測する *in silico* (virtual) screening の手法が連結されるものと予想している。膨大な数の化合物ライブラリーの中から HTS の手法で薬効・動態特性の優れた化合物を選んでくる過程は、欧米の Big Pharma にとっても、経済的に楽なことではなく、*in silico* screening の手法を併用しながら、明らかに動態特性が悪いと予測される化合物は、あらかじめライブラリーの中から除いておく、いわゆる “Value-added library” の充実が期待される³⁾。このように精選されたライブラ

**現状分析:個々の段階では動態特性を評価する
方法論の急速な進歩がある。**

- * 消化管吸収: Caco-2細胞 + トランスポーターおよびCYP3A4発現系
- * 代謝: ヒト肝ミクロソーム、ヒト肝細胞 (Cryopreserved, Fresh)、代謝酵素発現系
- * 輸送 (肝、腎でのクリアランスに関わるもの):
ヒト肝、腎組織の利用
ヒトトランスポーター発現系の利用 (double transfectant)
—— どの程度の種類が必要か?
—— 特異的阻害剤の探索
- * トランスポーターのSNPsの探索: 探索段階で個人差を避ける
- * 相互作用の回避の為の方法論: 探索段階 (HTS)

動態情報を薬効特性、毒性特性のHTSデータと統合化させ半定量化する為の方法論の確立の必要性 (QIDSM)

図 2-2 動態特性の評価法の進歩とこれからの方向性

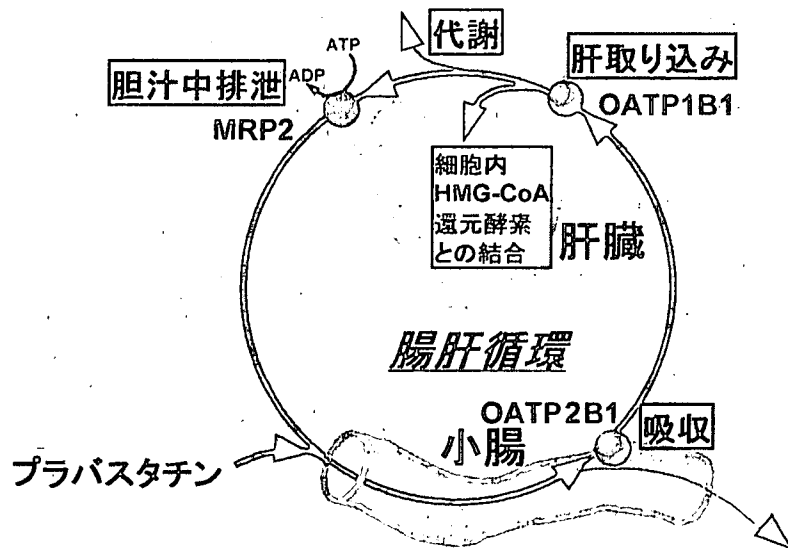


図 2-3 プラバスタチンの腸肝循環に関わるトランスポーター群

リーの中から、精度のよい動態スクリーニング法で、真に動態特性の優れた化合物を選択してることが必要とされる。私がよく出す例として、HMG-CoA還元酵素阻害剤であるプラバスタチンがある。本薬剤は、肝臓でのコレステロール合成阻害活性が薬効に関わっている。この薬は、経口投与された後の薬物動態、すなわち消化管吸収、肝臓への取り込み、肝臓から胆汁中への排泄のいずれの過程にもトランスポーターが関与することが明らかになっている。そのため効率のよい腸肝循環が生じており、薬物を標的組織である肝臓にとどめ効果の上昇を狙うとともに、循環血中への出現を最小化し、副作用の軽減を実現している (図 2-3)。このように一つの化合物を複数のトランスポーターに認識させることにより、吸収・分布・排泄のそれぞれの過程において、理想的な動態特性を付与することも可能と考えられる。プラバスタチンのこうした特性は開

発後に明らかにされたものであるが、今後は探索段階から strategic に優れた動態特性をもつ薬の創製を目指すことが望まれる。そのことによりブロックバスターズを世に出すことも夢ではないと考えている。

2-1

創薬の探索過程における薬物動態研究

2-1-1 *in vitro* 実験からヒト *in vivo* 薬物動態の予測とその妥当性評価

薬物代謝の領域においては、代謝安定性の試験法、相互作用の試験法ともにほぼ確立してきたといえる⁴⁾。一方で、近年、トランスポーター研究の急速な進展に伴い、薬効・副作用を規定する要因としてのトランスポーターの重要性が認識されており、薬理学の教科書“Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics”の第11版から、トランスポーターに関する独立した1章が新たに設けられた⁵⁾。しかしながら、吸収特性、肝臓・腎臓・脳への移行特性のスクリーニングについては、未だ十分ではない。例えば、吸収特性の評価スクリーニング系として汎用されているCaco-2細胞は、トランスポーターを介した吸収の評価には十分ではなく、今後種々の工夫が必要である。凍結ヒト肝細胞、ヒト腎スライス、また各種トランスポーターの発現系を用いたヒトにおける薬物動態の予測法を確立させていくためには、*in vitro* 実験から得られた予測値が、ヒト *in vivo* の特性値と近いことを validate することが必要になるが、この validation が最も困難であると感じている。ヒト肝における薬物代謝能力については、各種 cytochrome P450 (CYP) enzyme に対する適切な probe drug を用いて血中、尿中における親化合物、代謝物を測定し、pharmacokinetic 解析を行うことで、肝代謝能力を推定することが可能である。事実、適切な probe drug を混ぜたいわゆるカクテルをヒトに投与した後に、それらを分離定量して CYP の 5～7 種類の isoform の活性を同時に評価する方法が既に確立されている^{6～8)}。

ヒト CYP により代謝を受ける化合物について、*in vitro* (細胞, オルガネラ) で代謝初速度を測定し、適切な数学モデルを用いて *in vivo* における代謝クリアランスを予測することに成功している。例えば、YM796 をラット・イヌ・ヒトに投与すると、ラットにおいてのみ、肝初回通過代謝に起因する非線形動態が観察される。そこで、*in vitro* 実験から得られた飽和性のパラメータを用いて、非線形代謝を考慮した dispersion model に基づいたシミュレーションを行ったところ、すべての動物種において投与量依存的な AUC の変化を予測することに成功した⁹⁾ (図 2-4)。

薬物代謝における薬物間相互作用についても、*in vitro* 試験で得られるパラメータをもとに数学モデルに基づいて *in vivo* での相互作用を定量的に予測することが可能になっている。例えば、単純な競合・非競合阻害の場合には、図 2-5 に示す式から、阻害剤併用時の AUC の上昇率を計算することが可能である。この計算の際に、蛋白非結合型の循環血中薬物濃度の見積もりが問題となるが、これについては数学モデルによる考察より、false negative を避けるための最大濃度