

# 解毒・排出系の遺伝子多型に基づく薬剤応答、副作用の予測

●松崎 彰信<sup>1)3)</sup> ◆和田 守正<sup>2)</sup> ◆住江 愛子<sup>3)</sup>

1) 九州大学医学部保健学科 2) 九州大学大学院医学研究院医化学分野 3) 九州大学病院小児科

## ＜研究の目的と進め方＞

薬剤の効果や副作用発現には大きな個人差が存在する。薬剤投与量を患者の体重または体表面積によって決定する従来の方法では、薬効が十分に得られない場合や予測外の副作用が発現することをしばしば経験する。薬効および副作用の程度は、薬剤の消化・吸収・分配・代謝・排泄の総和として決まるため、この過程に個人差があれば、薬効や副作用は変化することとなる。従って、副作用を最低限に抑え最大の薬効を得るために、各過程に関与する遺伝的背景を解析し、遺伝子多型に基づく個人に最適化されたオーダーメイド治療の実現が期待される。本研究では、オーダーメイド治療を確立するための第1段階として、薬剤への応答性と副作用に重大な影響を持つと考えられる解毒酵素排出系のうち、最終段階に関与する薬剤排出機構の実態であるABCトランスポータをモデル型とし、遺伝子多型に基づいた薬効および副作用の予測さらには発がんとの関連解析を行う。

- (1) 遺伝子多型の収集
- (2) 基質特異性と薬効・副作用データベースの構築
- (3) 臨床例での遺伝子多型と薬効・副作用の相関解析
- (4) 遺伝子多型と発がんとの関連解析
- (5) 遺伝子多型とmRNA発現量との関連解析

## ＜研究開始時の研究計画＞

ABCトランスポータのなかでもMDR1およびMRP2を主体に解析する。

### ＜MDR1＞

- (1) 遺伝子多型の収集
- (2) プロモーター領域の多型と遺伝子発現量の相関
- (3) 小児急性リンパ性白血病(ALL)における遺伝子多型と既知の予後因子・薬効・副作用との相関解析
- (4) 遺伝子多型と白血病発症頻度との相関解析
- (5) ノックアウトマウスによる解析

### ＜MRP2＞

- (1) 遺伝子多型の収集
- (2) プロモーター領域の多型と遺伝子発現量の相関
- (3) ALLにおける遺伝子多型と薬効・副作用との相関解析

## ＜研究期間の成果＞

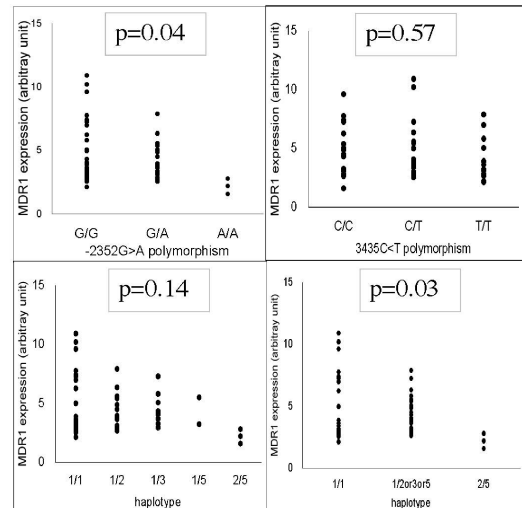
### ＜MDR1＞

(1) 遺伝子多型の収集：プロモーター領域4kbに6か所の新規多型を含む計8か所の多型を同定した。(−2903 T>C, −2410 T>C, −2352 G>A, −1910 T>C, −1717 T>C, −1325 A>G, −934 A>G, −692 T>C)

(2) プロモーター領域の多型と遺伝子発現量の相関：アレル頻度を考慮し、a;−2410 T>C, b;−2352 G>A, c;−1910 T>C, d;−934 A>G, e;−692 T>Cの5つの多型を解析対象とした。これらの多型が形成しうるハプロタイプは、3種類で全体の96%を占めた。これら3種類のハプロタイプは、レポーターアッセイによる発現活性に差が認められ、また大腸粘膜、肝組織およびリンパ球においてディプロタイプとmRNA発現量が相関することが認められた。さらに、ゲ

ルシフトアッセイにより、−2352 G>A, −692 T>Cの両多型がMDR1遺伝子発現量の決定に重要な役割を果たしていることを示した。

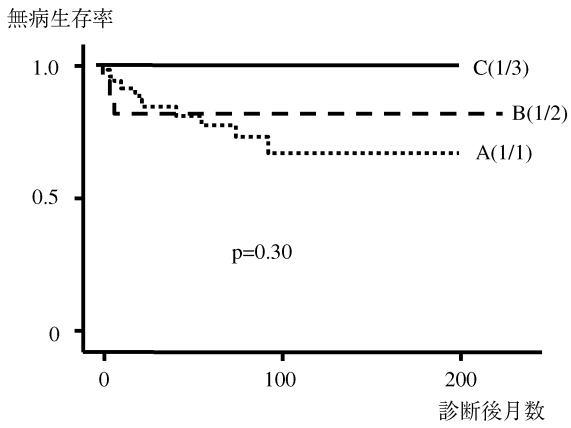
遺伝子多型・Haplotype および mRNA の関連 (リンパ球)



(3) 小児急性リンパ性白血病(ALL)における遺伝子多型と既知の予後因子・薬効・副作用との相関解析：遺伝子多型3435 C>Tにおいて白血病細胞表面マーカーとの間に有意な相関を認めた。また、遺伝子多型-2352 G>Aにおいてメトトレキサート投与後の血清ビリルビン値との間に相関傾向を認めた。遺伝子多型(diplotype)と無病生存率・全生存率との間には相関を認めなかった。

3435C>T	白血球数	マーカー	ビリルビン	予後
C/C	<1万	18 B系	26 高値	10 生存
	≥1万	19 非B	10 低値	15 死亡
C/T&T/T	<1万	43 B系	72 高値	25 生存
	≥1万	34 非B	5 低値	30 死亡
p 値	0.47	<0.01	0.65	0.33

−2352G>A	白血球数	マーカー	ビリルビン	予後
G/G	<1万	36 B系	62 高値	24 生存
	≥1万	35 非B	8 低値	23 死亡
G/A&A/A	<1万	15 B系	27 高値	7 生存
	≥1万	19 非B	7 低値	18 死亡
p 値	0.62	0.21	0.06	0.91



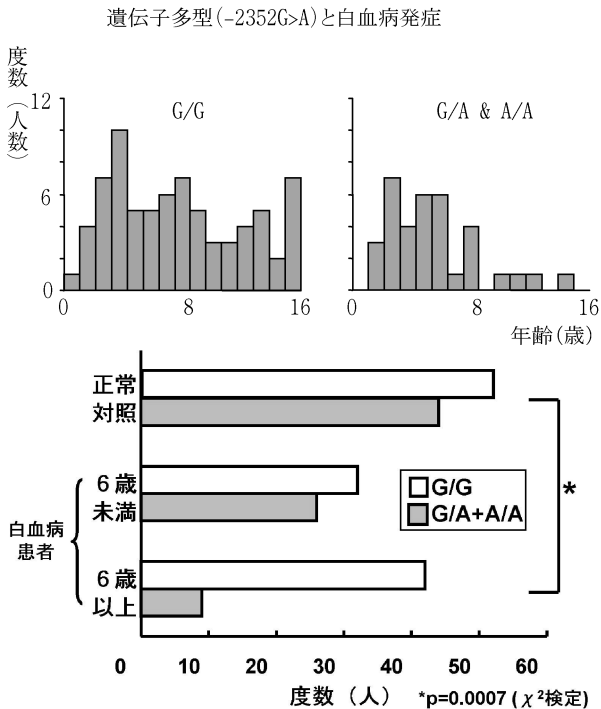
(4) 遺伝子多型と白血病発症頻度との相関解析：ALL患者群では、-2352G>AのG/G多型(p=0.04, OR=1.8)およびディプロタイプA(p=0.02, OR=2.1)の出現頻度が対照群に比べて有意に高かった。

-2352G>A	患者	対象	p	オッズ比
G/G	74	52	0.03	1.8
G/A&A/A	35	44		

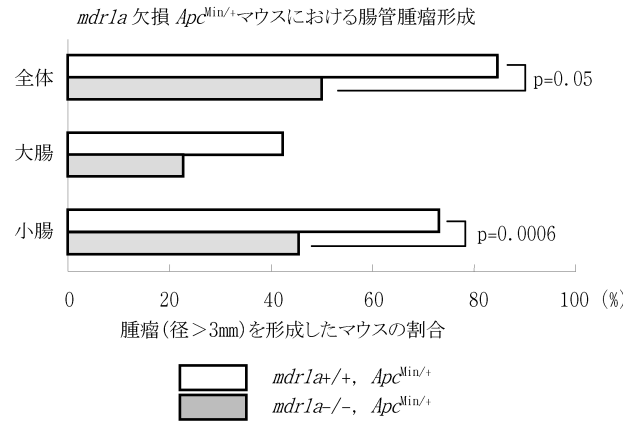
Haplotype	患者	対象	p	オッズ比
1/1	59	42	0.01	2.1
Others	31	46		

-2352 G>A多型において、G/G 多型はそれ以外に比べて発症年齢が高く (6.5歳 vs 5.4歳, p < 0.01)、対照群との比較でも6歳以上発症群におけるG/G多型の出現頻度が有意に高かった (p < 0.01, OR=3.9)。3435C> Tについても、ALLにおいてT/T多型がそれ以外に比べて高頻度であった (p < 0.01, OR=2.8)。以上より小児ALLの発症にMDR1が関与している可能性が示された。



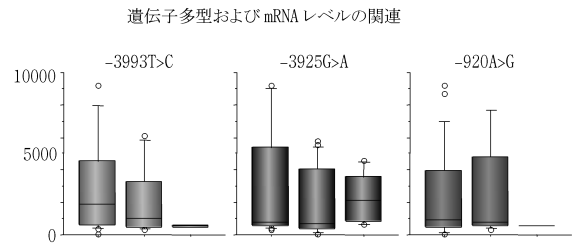
(5) ノックアウトマウスによる解析：Apcヘテロ変異マウスを背景に作成したmdr1a欠損マウスでは、野生型に

比べて腸管のがんが少なく、MDR1は抗アポトーシス作用を示し発がんに促進的に働く可能性が示された。ALL群における-2352G>A多型のメジャーアレルの頻度が高かったことから、MDR1が白血病発症にも促進的に働いている可能性が示された。



<MRP2>

- 遺伝子多型の収集：32個のエキソンと周辺イントロンを解析し、エキソン部に4か所とイントロン部に6か所の多型を同定した。また、プロモーター領域4kbに10か所の多型を同定した。
- プロモーター領域の多型と遺伝子発現量の相関：-3993 T>C, -3925 G>A, および3972 C>Tの多型と肝組織におけるmRNA発現量がそれぞれ相関することを見出し、遺伝子発現量の決定にこれらの多型が重要な役割を果たしている事を示した。



(3) ALLにおける遺伝子多型と薬効・副作用との相関解析：遺伝子多型 (3972 C>T, 1249 G>A, 2620-2133 C>T, -924 G>A) と既知の予後因子・予後・抗がん剤の副作用との関連について解析した。3972 C>T および -924 G>A多型は、各々診断時白血球数・白血病細胞表面マーカーおよび白血病細胞表面マーカー・メソトレキセート投与後の血清ビリルビン値との間に相関傾向を認めた。遺伝子多型と無病生存率・全生存率との間には相関を認めなかった。

3972C>T	白血球数	マーカー	ビリルビン	予後
C/C	<1万	B系	高値	生存 58
	≥1万	非B	低値	死亡 10
C/T&T/T	<1万	B系	高値	生存 34
	≥1万	非B	低値	死亡 6
p値	0.10	0.12	>0.99	>0.99

-924G>A	白血球数	マーカー	ビリルビン	予後
---------	------	------	-------	----

G/G	<1万	36	B系	62	高値	27	生存	62
	≥1万	32	非B	5	低値	19	死亡	9
G/A&A/A	<1万	39	B系	61	高値	22	生存	63
	≥1万	38	非B	12	低値	31	死亡	15
p値	0.87		0.13		0.11		0.37	

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究で同定された多型には、多型の頻度に人種差を考慮すべきことが明らかとなった。また、ABCトランスポータ遺伝子多型と発現量および薬効や副作用発現などの臨床パラメーターとの関連を解析した報告はほとんどない。小児白血病患者における検討は本研究が唯一のものである。MDR1についてはin vitroの解析系で多型による遺伝子発現の差を確認しており、小児ALLの発症におけるMDR1の関連を示唆した点で獨創性が高い。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

MRP2 -3993 T>Cおよび-3925 G>A多型部位は、繰り返し配列が多く、PCRプライマーの再設定にもかかわらず解析効率が不良であった。故に、それぞれとリンクが認められたint19 C>Tおよび-924 G>A多型に解析部位を変更することにより、著明に効率は改善された。また、現行のがん治療の多くは多剤併用療法であり、それぞれの薬剤の薬効・副作用を分離すること、あるいは、特定の薬剤の副作用と遺伝子多型の明らかな相関を証明することが困難であった。

#### 〈今後の課題〉

- (1) MRP1, 3, 4遺伝子の多型収集：MRP2遺伝子と同様、全塩基配列の決定により多型の収集を行う。
- (2) 遺伝子多型と薬剤応答性・副作用発現の関連解析の拡大と加速：さらに症例数を増やすことにより、薬剤の血中濃度などと多型との相関解析を行う。
- (3) 遺伝子発現の個人差の分子的背景解析：エピジェネティックな機構による異物排出系の個人差を検討する。MRP1, 2, 3遺伝子のプロモーター領域CpG部位のメチル化状態を定量し、発現量の決定に重要な部位を特定する。
- (4) 薬剤の吸収・代謝・排泄に關与する遺伝子多型を包括的に解析し、臨床像との相関の有無を検討する。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Hashimoto K, Uchiumi T, Konno T, Ebihara T, Nakamura T, Wada M, Sakisaka S, Maniwa F, Amachi T, Ueda K, Kuwano M. Trafficking and functional defects by mutations of the ATP-binding domains in MRP2 in patients with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology*, 36: 1236-1245, 2002
2. Tada Y, Wada M, Taguchi K, Mochida Y, Kinugawa N, Tsuneyoshi M, Naito S, Kuwano M. The Association of DAP-kinase Hypermethylation with Early Recurrence in Superficial Bladder Cancers. *Cancer Res*, 62: 4048-4053, 2002
3. Tada Y, Wada M, Migita T, Nagayama J, Hinoshita E, Mochida Y, Maehara Y, Tsuneyoshi M, Kuwano M, Naito S. Increased expression of multidrug resistance-associated proteins in bladder cancer during clinical course and drug resistance to doxorubicin. *Int J Cancer*, 98: 630-635, 2002
4. Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, Ihara K, Nagatoshi Y, Kawa K, Okamura J, Hara T: Polymorphisms of transforming growth factor-beta 1 and transforming growth factor-beta 1 type II receptor genes are associated with acute graft-versus-host disease in children with HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 30: 665-671, 2002

5. Matsuzaki A, Suminoe A, Hara T: Antithrombin III supplementation in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with L-asparaginase. *Pediatr Hematol Oncol*, 19: 601-603, 2002
6. Matsuzaki A: Adding prolonged asparaginase therapy to standard treatment may improve event-free survival among children with acute lymphoblastic leukemia. *Evidence-based Oncol*, 3: 41-42, 2002
7. Taniguchi S, Mochida Y, Uchiumi T, Hayashi K, Takagi K, Maehara Y, Shimada M, Kuwano H, Kono S, Nakano H, Kuwano M, Wada M. Genetic polymorphism at the 5' regulatory region of MDR1 and its association with inter-individual variation of expression level in colon. *Mol Can Ther*, 2: 1351-1359, 2003
8. Wada M, Uchiumi T, Kuwano M. Canalicular multispecific organic anion transporter, ABCC2. In: *MEMBRANE TRANSPORT DISEASES -Molecular basis of inherited transport defects-*, edited by S. Bröer and C. A. Wagner NY. Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 263-289, 2003
9. Mochida Y, Taguchi K, Taniguchi S, Tsuneyoshi M, Kuwano H, Tsuzuki T, Kuwano M, Wada M. The role of P-glycoprotein in intestinal tumorigenesis: disruption of mdrla suppresses polyp formation in ApcMin/+ mice. *Carcinogenesis*, 24: 1219-1224, 2003
10. Konno T, Ebihara T, Hisaeda K, Uchiumi T, Nakamura T, Shirakusa T, Kuwano M, Wada M. Identification of Domains Participating in the Substrate Specificity of the Multidrug Resistance Proteins, MRP1 and MRP2. *J Biol Chem*, 278: 22908-22917, 2003
11. Kuwano M, Uchiumi T, Hayakawa H, Ono M, Wada M, Izumi H, Kohno K. The Basic and Clinical Implication of ABC transporters, YB-1 and Angiogenesis in Human Malignancies. *Cancer Science*, 94: 9-14, 2003
12. Koga Y, Matsuzaki A, Suminoe A, Hattori H, Hara T: Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of anti-tumor effect by neutrophils. *Cancer Res*, 64: 1037-1043, 2004.
13. Suminoe A, Matsuzaki A, Hattori H, Koga Y, Kinukawa N, Ishii E, Hara T: Characteristic expression of apoptosis-associated genes in infant acute lymphoblastic leukemia: low Fas expression is an independent predictor for poor prognosis. *Leukemia*, 18: 365-368, 2004
14. Ishikawa T, Tsuji A, Inui K, Sai Y, Anzai N, Wada M, Endou H, Suminoe Y. The genetic polymorphism of drug transporters: functional analysis approaches. *Pharmacogenomics*, 5: 1-33, 2004
15. Kobayashi, Y., Ishihara, T., Wada, M., Kajihara, S., Araki, J., Mifujii, R., Itani, T., Kuroda, M., Urawa, F., Kaito, M. and Adachi, Y. Dubin-Johnson-like black liver with normal bilirubin level. *Journal of Gastroenterology*. 39: 892-895, 2004.
16. Matsuzaki A, Nagatoshi Y, Inada H, Nakayama H, Yanai F, Ayukawa H, Kawakami K, Moritake H, Suminoe A, Okamura J: Prognostic Factors for Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Impact of Allogeneic Stem Cell Transplantation. A Report from the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group. *Pediatr Blood Cancer*, 45: 111-120, 2005
17. Koga Y, Matsuzaki A, Suminoe A, Hattori H, Kanemitsu S, Hara T: Differential mRNA expression of glucocorticoid receptor a and b is responsible for glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatr Blood Cancer*, 45: 121-127, 2005
18. Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, Koga Y, Tashiro K, Hara T: Identification of novel genes with prognostic value in childhood leukemia using cDNA microarray and quantitative RT-PCR. *Pediatr Hematol Oncol*, in press.
19. Wada, M. Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 and ABCB1 genes and their clinical impact in physiology and drug response. *Cancer Letters*, in press.