

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

●和田守正

九州大学大学院医学研究院

〈研究の目的と進め方〉

薬効、副作用の遺伝的背景を把握して、遺伝子多型に基づく、個々人に最適化されたテーラーメイド治療の実現が期待されるが、ようやく始まったばかりである。薬剤の解毒酵素系の遺伝子多型が薬剤への応答性に重大な影響を持つと考えられているが、解毒抱合体の生体外への排出機構も薬剤の体内動態に関与することが明らかにされはじめた。このような背景から本研究は、薬剤の排出機構を担うABCトランスポーター遺伝子群を対象として、遺伝子多型に基づいた薬効、副作用の予測系の構築を目指す。

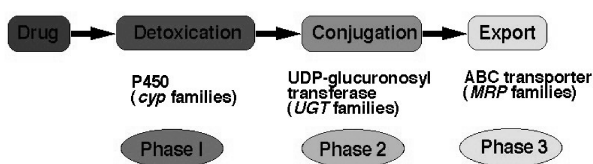


図1 解毒の3段階

〈研究開始時の研究計画〉

- 【1】ABCトランスポーター遺伝子の多型の収集
- 【2】ABCトランスポーターの基質特異性と薬効、副作用データベースの構築および基質スクリーニング系の構築
- 【3】遺伝子多型と遺伝子発現量との相関解析
- 【4】ABCトランスポーターの遺伝子多型に基づいた薬効、副作用解析

〈研究期間の成果〉

- 【1】ABCC2遺伝子について、35個のエキソンと周辺イントロンおよびプロモーター4kbに、それぞれ5ヶ所、6ヶ所および10ヶ所の遺伝子多型を同定した。
- 【2】ABCトランスポーターの基質薬剤データベースを作成するために、ABCB1、ABCC1、ABCC2およびABCC3遺伝子の導入細胞を用いて、蛍光モデル基質の輸送に対する阻害活性を指標にする基質スクリーニング系構築の予備実験を終了した。
- 【3】遺伝子多型とともにエピジェネティックな機構が異物排出ポンプ発現量の個人差に関与していることが示唆された。(成果10, 11, 13)
- 【4】喘息患者に対するロイコトリエン阻害剤、および小児白血病患者に対する抗がん剤の薬効、副作用データおよび末梢血検体の収集を、患者の同意を得て開始した。既採取試料の使用についても、連結不可能匿名化の条件付きで許可を得た。

その後、2002～2004年度まで、松崎彰信班員の研究分担者として研究を継続、発展させ、以下の成果を上げた。

- 【5】遺伝子多型と遺伝子発現量との相関解析：ABCB1遺伝子の制御領域に注目し、新規多型を同定した。-

2410T>C, -2352G>A, -1910T>C, -934A>G, -692T>Cの5つの多型に注目してハプロタイプを組むと、3種類で全体の95%をカバーできることを明らかにした。レポーターアッセイにより、ハプロタイプによる発現活性の差異を明らかにした。大腸粘膜と肝組織において、ディプロタイプとmRNA発現量が相関することを示し、ゲルシフトアッセイにより、-2352G>A, -692T>Cの両多型が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。(成果5)

同様に、ABCC2遺伝子に関しては、-3993T>C, -3925G>A, 3972C>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いだした。

【6】遺伝子多型の機能解析：アミノ酸置換を伴う遺伝子多型の機能におよぼす影響を生化学的に解析し、分子疫学解析と創薬のための基盤を作った。(成果1, 2, 3, 4, 7, 9,)

【7】小児急性リンパ性白血病(ALL)における薬剤応答解析：ABCB1の遺伝子多型-2352G>AおよびABCC2遺伝子の-924G>A多型について、メソトレキサート投与後の血清ビリルビン値との間に有意な相関を認めた。ABCC2遺伝子

【8】ABCトランスポーターの遺伝子多型と発がん予測：先ず、Abcb1欠損マウスを用いて、Abcb1遺伝子が発がんに関与していることを明らかにした。(成果6)次に、ALL患者群では、-2352G>Aのメジャーアレルおよびメジャーディプロタイプの出現頻度が対照群に比べ有意に高く、発症年齢とも相関したことから、小児ALLの発症にABCB1が関与している可能性が示された。さらに大腸がんの症例対照研究においても同様の相関を認め、年齢や臓器を越えてABCB1が腫瘍発生へ関与することが示された。

〈国内外での成果の位置づけ〉

【1】本研究で同定された遺伝子多型の1/3は、国内外のデータベースに登録されていなかった。人種差が一因だが、一方で、既存のデータベースはコード領域とコアプロモーターに解析対象を限定していることが原因である。発現量との相関解析でも、上流プロモーターの関与が大きいことが分かったので、今回の解析の意義が認識される。今後、HapMapデータによる相関解析との比較検討により、広範な遺伝子制御領域の多型解析の重要性がさらに明らかになると期待される。

【2】ABCトランスポーターの発がんへの関与は、意外性を持った結果であり、新聞報道にも取り上げられた。さらに本研究の中で、遺伝子多型をツールとして用いた大腸がんの症例対照研究によってヒトにおいてもその関与が証明できたことは大きな成果であった。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

多型の収集と比較して、臨床データと献体の収集に時間をとられ、相関解析も困難を極めた。1つは倫理の問題であるが、もう一つは、現行の癌治療の多くが多剤併

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がきわめて困難なことによる。顕著な薬効・副作用を示す症例を積極的に収集することが必要と思われる。さらに統計学的処理に耐えうる症例数を確保するために、多施設共同研究が必要である。さらに、長期的には新薬の治験段階で解析できるような系統的研究体制を、より大きな研究組織レベルで構築することが国家戦略としては必須であると考えている。

〈今後の課題〉

【1】 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：薬剤の血中濃度、尿などへの排泄量、腫瘍細胞の減少速度、長期寛解率、血液生化学データなどと多型との相関解析を継続、拡大する。

【2】 他疾患への、解析対象の拡大：単純な治療プロトコルが行われている疾患に注目する。

【3】 薬剤応答の包括的解析：P450やグルクロン酸抱合酵素などの解毒酵素や取り込みトランスポーターの寄与も併せて総合的に解析する。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

原著論文

1. Wada, M. Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 and ABCB1 genes and their clinical impact in physiology and drug response. *Cancer Letters*, in press.
2. Ishikawa, T., Tsuji, A., Inui, K., Sai, Y., Anzai, N., Wada, M., Endou, H., Sumino, Y. The genetic polymorphism of drug transporters: functional analysis approaches. *Pharmacogenomics*, 5: 1-33. 2004.
3. Kobayashi, Y., Ishihara, T., Wada, M., Kajihara, S., Araki, J., Mifuji, 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.
4. Wada M, Uchiumi T, and Kuwano M: MEMBRANE TRANSPORT DISEASES -Molecular basis of inherited transport defects-, edited by S. Bröer and C. A. Wagner: Canalicular multispecific organic anion transporter, ABCC2., P. 263-289, NY. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.
5. 0403201517
Taniguchi, S., Mochida, Y., Uchiumi, T., Tahira, T., Hayashi, K., Takagi, K., Shimada, M., Maehara, Y., Kuwano, H., Kono, S., Nakano, H., Kuwano, M. and Wada, M. Genetic polymorphism at the 5' regulatory region of MDR1 and its association with inter-individual variation of expression level in colon. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2: 1351-1359, 2003.
6. 0403201603
Mochida, Y., Taguchi, K., Taniguchi, S., Tsuneyoshi, M., Kuwano, H., Tsuzuki, T., Kuwano, M. and Wada, M. The role of P-glycoprotein in intestinal tumorigenesis: disruption of mdrla suppresses polyp formation in ApcMin/+ mice. *Carcinogenesis*, 24: 1219-1224, 2003.
7. 0403201621
Konno, T., Ebihara, T., Hisaeda, K., Uchiumi, T., Nakamura, T., Shirakusa, T., Kuwano, M. and Wada, M., Identification of Domains Participating in the Substrate Specificity of the Multidrug Resistance Proteins, MRP1 and MRP2. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 22908-22917, 2003.

8. Kuwano, M., Uchiumi, T., Hayakawa, H., Ono, M., Wada, M., Izumi, H. and Kohno, K., The Basic and Clinical Implication of ABC transporters, YB-1 and Angiogenesis in Human Malignancies. *Cancer Science*, 94: 9-14, 2003.

9. 0403201627

Hashimoto, K., Uchiumi, T., Konno, T., Ebihara, T., Nakamura, T., Wada, M., Sakisaka, S., Maniwa, F., Amachi, T., Ueda, K. and 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.

10. Tada, Y., Wada, M., Taguchi, K., Mochida, Y., Kinugawa, N., Tsuneyoshi, M., Naito, S. and Kuwano, M., The Association of DAP-kinase Hypermethylation with Early Recurrence in Superficial Bladder Cancers. *Cancer Research*, 62: 4048-4053, 2002.

11. Tada, Y., Wada, M., Migita, T., Nagayama, J., Hinoshita, E., Mochida, Y., Maehara, Y., Tsuneyoshi, M., Kuwano, M. and Naito, S., Increased expression of multidrug resistance-associated proteins in bladder cancer during clinical course and drug resistance to doxorubicin. *International Journal of Cancer*, 98: 630-635, 2002.

12. 0111161238

Nagayama, J., Iino, M., Tada, Y., Kusaba, H., Kiue, A., Ohshima, K., Kuwano, M. and Wada, M., Retrovirus insertion and transcriptional activation of the multidrug resistance (mdrla) gene in leukemias treated by a chemotherapeutic agent in vivo. *Blood*, 97: 759-766, 2001.

13. 0111151857

Tada, Y., Wada, M., Kuroiwa, K., Kinugawa, N., Harada, T., Nagayama, J., Nakagawa, M., Naito, S. and Kuwano M., MDR1 gene overexpression and altered degree of methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment. *Clinical Cancer Research*, 6: 4618-4627, 2000.

14. Harada, T., Nishie, A., Torigoe, K., Ikezaki, K., Shono, T., Mehara, Y., Kuwano, M. and Wada, M., The specific expression of three novel splice variant forms of human metalloprotease-like disintegrin-like cysteine-rich protein 2 gene in brain tissues and gliomas. *Japanese Journal of Cancer Research*, 91: 1-6, 2000.

15. 0111151614

Harada, T., Nagayama, J., Kohno, K., Lyn, M., Fojo, T., Kuwano, M. and Wada, M., Alu-associated interstitial deletions and chromosomal rearrangement in two human multidrug resistant cell lines. *International Journal of Cancer*, 86: 506-511, 2000.

新聞報道

1. 「大腸がん 特殊タンパク質が関与」、毎日新聞、2003年5月9日、朝刊
2. 「ポンプたんぱく がん発生を促進」、朝日新聞、2003年5月17日、夕刊

特許

1. 特許第3695858号 (2003年7月8日)
名称：ヒトcMOAT遺伝子とそのcDNA
2. 出願番号：特願2003-332584
名称：MDR1遺伝子の5' 制御領域におけるSNPs (出願中)