

# 日本人に高頻度で認められる「ABC 輸送体の一塩基多型」と「がんの抗がん剤耐性」との相関評価

中部大学応用生物学部

食品栄養科学科 准教授 中川 大

## 1. 研究の背景・目的

「がん」は、現在、日本人の2人に1人が罹患する疾患である。そして、高齢者を支える40代～60代までの現役世代における死因の第一が「がん」である(右表, 厚生労働省 人口動態統計年報)。がんの治療では、8割以上の患者が化学療法を施される。しかしながら、現在の化学療法が示す奏効率は20～60%であり、単剤で30%以上の奏効率を示す薬剤は無い(がん研有明病院 HP)。したがって、この奏効率を高める治療法の確立が急務である。

がんを抗がん剤耐性に導く因子として、ABC 輸送体が見出されている。この ABC 輸送体は、複数の抗がん剤を基質として認識することができ、細胞内に侵入する抗がん剤を細胞外に排出し、がんを抗がん剤耐性にする。ABC 輸送体をコードする遺伝子は、ヒトゲノム上に49種存在し、それらの遺伝子上には、保有する人の頻度が1000人に5人以上と推定されている「アミノ酸置換を伴う一塩基多型」が計200以上存在することが報告されている(Human Genetic Variation Browser, Integrative Japanese Genome Variation Database)。一塩基多型の存在によってアミノ酸が置換されると、基質にたいする ABC 輸送体の親和性が変化する場合がある<sup>1</sup>。したがって、ABC 輸送体が認識する抗がん剤を理解し、その基質認識にたいする一塩基多型の影響を理解することができれば、遺伝子診断を通じて患者毎に最適な化学療法を提供することが可能になる。

本研究では、「がんの化学療法における奏効率の向上」と「テーラーメイド医療の実現」を見据え、がんを抗がん剤耐性に導く ABC 輸送体に注目し、その遺伝子上に存在する一塩基多型を基点にして研究を展開する。具体的には、次の3つの課題を解決することを目指した。

課題1. ABC 輸送体とその一塩基多型バリエーションをそれぞれ安定発現する細胞の樹立

課題2. ABC 輸送体と抗がん剤との関係の理解

課題3. がんの薬剤感受性を制御する一塩基多型の同定

## 2. 研究の対象ならびに方法

本研究では、ヒト ABC 輸送体 *ABCC4* 遺伝子および *ABCG2* 遺伝子を研究対象に選定した。また、Invitrogen 社が提供する Flp-In system を用いて、野生型および一塩基多型バリエーションの ABC 輸送体を安定発現する細胞を樹立した。そして、それぞれの細胞内に存在する total RNA から cDNA を調製し、その cDNA を用いて定量 PCR を行った。強制発現させた ABC 輸送体遺伝子に関して、野生型 ABC 輸送体遺伝子を導入した細胞と同程度の当該 ABC 輸送体 mRNA を発現していた細胞を選定し、それぞれの細胞における抗がん剤感受性を MTT assay にて評価した。また、それぞれの細胞から細胞溶解液を調製し、western blotting を実施して、それぞれの細胞における *ABCC4* あるいは *ABCG2* の細胞内存在量を評価した。

## 3. 研究結果

樹立した細胞から調製した cDNA を用いて定量 PCR を行った結果、*ABCC4* (M184K, N297S, K304N, P403L, E757K) あるいは *ABCG2* (P269S) をそれぞれ発現させた細胞において、*ABCC4* あるいは *ABCG2* mRNA 量が野生型 *ABCC4* あるいは野生型 *ABCG2* を発現させた細胞と同程度であることが見出された。そこで、これらの一塩基多型バリエーションをそれぞれ発現する細胞を用いて MTT assay を実施した。

MTT assay の結果、*ABCC4* 一塩基多型バリエーションをそれぞれ発現させた細胞は、野生型 *ABCC4* を発現させた細胞と比して、1.2~1.7 倍高い azathioprine 感受性を示した。また、*ABCC4* (K304N, E757K) をそれぞれ発現させた細胞は、野生型 *ABCC4* を発現させた細胞と比して、1.4~2 倍高い 6-mercaptopurine 感受性を示した。さらに、*ABCC4* (K304N, P403L, E757K) をそれぞれ発現する細胞は、野生型 *ABCC4* を発現する細胞と比して、1.9 倍高い SN-38 感受性を示した。一方、これらの一塩基多型バリエーションを発現する細胞における *ABCC4* タンパク質の細胞内存在量を Western blotting にて評価した結果、細胞間で差は認められなかった。なお、これらの結果については、International Journal of Molecular Sciences 誌に掲載されている<sup>2</sup>。

*ABCG2* (P269S) を発現させた細胞は、野生型 *ABCG2* を発現させた細胞と比して、3.1 倍あるいは 3.5 倍高い mitoxantrone 耐性と SN-38 耐性を示した。一方、これらの一塩基多型バリエーションを発現する細胞における *ABCG2* タンパク質の細胞内および細胞膜上の存在量を

Western blottingにて評価した結果、ABCG2(P269S)を発現させた細胞と野生型 ABCG2 を発現させた細胞との間で差は認められなかった。

#### 4. 考察

Western blottingの結果から、ABCC4(M184K, N297S, K304N, P403L, E757K)は、いずれも ABCC4 の細胞内安定性に影響を与えないと言える。一方、MTT assayの結果は、ABCC4 タンパク質上の184, 297, 304, 403, 757番目のアミノ酸残基が細胞の抗がん剤感受性に影響を及ぼすことを示している。この分子メカニズムについては、さらなる実験による解析が必要であるが、これらの一塩基多型によってABCC4の①基質特異性、②細胞内局在が変化している可能性が考えられ、現在は②細胞内局在が変化している可能性について評価を行っている。なお、これらの一塩基多型の臨床的意義については、現在、愛知県がんセンター研究所の松尾恵太郎博士および伊藤秀美博士の協力を得て評価を行っている。ABCG2(P269S)については、ABCG2 タンパク質の細胞内および細胞膜上における存在量に関して野生型 ABCG2 との間に差は認められなかった。一方、MTT assayでは、ABCG2(P269S)あるいは野生型 ABCG2 を発現させた細胞間において mitoxantrone および SN-38 感受性に差が認められた。したがって、ABCG2(P269S)は、ABCG2 の基質特異性に影響を及ぼしている可能性がある。

今後は、ABC 輸送体によって認識される抗がん剤を新たに同定することを継続して行うと共に、ABC 輸送体の一塩基多型バリエーションを細胞に安定発現させ、一塩基の違いに伴うアミノ酸置換によって、当該 ABC 輸送体が細胞に与える薬剤耐性がどのように変化するか(あるいは変化しないか)について、継続して評価を行う。

#### 5. 文献

1. Tamura, A., Wakabayashi, K., Onishi, Y., Nakagawa, H., Tsuji, M., Matsuda, Y., and Ishikawa, T. Genetic Polymorphisms of Human ABC Transporter ABCG2: Development of the Standard Method for Functional Validation of SNPs by using the Flp Recombinase System. *J. Exp. Ther. Oncol.*, 6, 1-11, 2006.
2. Tsukamoto M, Sato S, Satake K, Miyake M, Nakagawa H. Quantitative Evaluation of Drug Resistance Profile of Cells Expressing Wild-Type or Genetic Polymorphic Variants

of the Human ABC Transporter ABCC4. *Int. J. Mol. Sci.*, 18, E1435, 2017.