

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2009～2011

課題番号：21590191

研究課題名（和文）薬物結合性血漿蛋白の遺伝子型による抗がん剤応答性予測

研究課題名（英文）Association of genotypes for drug-binding protein with anti-cancer drug responses

研究代表者

佐井 君江（SAI KIMIE）

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・室長

研究者番号：20195960

研究成果の概要（和文）：

薬物結合性血漿蛋白 α -1-acid glycoprotein (AGP) をコードする *ORM* 遺伝子 (*ORM1* 及び *ORM2*) について、AGP の発現および抗がん剤応答性に影響する遺伝子型の同定を目的に、日本人のパクリタキセル (PTX) 投与患者を対象に、詳細な *ORM* 遺伝子の構造及び遺伝子多型/ハプロタイプ解析を実施し、これらと血清 AGP 値及び PTX 薬物動態との関連を調べた。その結果、血清 AGP 値ならびに PTX 代謝物の血中濃度・時間曲線下面積と相関する *ORM* 遺伝子型を同定した。また、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにて、*ORM1* 及び *ORM2* の発現調節領域を詳細に解析した結果、両遺伝子の発現・誘導の違いに関わる調節領域の存在の可能性が示唆された。なお *ORM1* プロモーター多型による発現影響についても検討した。

研究成果の概要（英文）：

This study was aimed to identify genetic polymorphisms of *ORM* genes (*ORM1* and *ORM2*), encoding α -1-acid glycoprotein (AGP), which might affect anti-cancer drug responses. Detailed analysis on *ORM* gene structures (duplication/deletion) and genetic polymorphisms/haplotypes were conducted for Japanese cancer patients who received paclitaxel (PTX)-therapy, and the association of *ORM* genotypes with serum AGP levels and PTX-pharmacokinetics were investigated. As a result, *ORM* genetic polymorphisms related to increased levels of serum AGP and the area under the plasma concentration-time curves of PTX-metabolites were identified. A luciferase reporter gene assay indicated existence of putative promoter regions which might be responsible for different regulatory mechanisms of gene expression between *ORM1* and *ORM2*. Possible influence of the *ORM* genetic polymorphism on the reporter activity was also examined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	0	1,500,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
2011 年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：オーダーメイド医療、 α -1-酸性糖蛋白、薬剤反応性、遺伝子多型、ハプロタイプ

1. 研究開始当初の背景

α -1-酸性糖蛋白(α -1-acid glycoprotein: AGP)は、肝臓で生成される急性期蛋白の一種であり、血漿中に 50-100 mg/dl 存在するとされる。一方、AGP の発現レベルには大きな個人差があり、複数の多様なアイソフォームが存在することも知られる。また、AGP は抗がん剤をはじめ、様々な薬物と結合することが知られ、そのため、薬物投与後の薬物血中濃度は、AGP 発現量に依存し、AGP の発現上昇により遊離の薬物血中濃度が低下し、その結果、薬効に影響する可能性が示唆されている。例えば、AGP と結合する抗がん剤ドセタキセル投与患者では、血中 AGP 濃度の高い患者において、ドセタキセル治療後の生存期間が短縮することも報告されている。

この AGP をコードする遺伝子には、相同性の高い 2 種類 (*ORM1*, *ORM2*) が知られ、同じ染色体上に縦列して存在する。*ORM* 遺伝子には、重複型 (同一遺伝子が 2 つ存在) や欠損型の他、人種毎に特徴的な様々な遺伝子型が存在することが示唆されてきたが、日本人の詳細な *ORM* 遺伝子のハプロタイプ (同一染色体上の個々の遺伝子多型の組み合わせ) は未だ明らかとなっていない。また、*ORM1* は *ORM2* より発現レベルが高いことが知られているが、各 *ORM* 遺伝子の発現調節機構の違いや、また遺伝子多型による AGP 発現ならびに薬物応答性 (薬物動態・有効性等) への影響についても、ほとんど不明である。

申請者らは、日本人由来の細胞株を用いて *ORM1* および *ORM2* 遺伝子構造を解析したところ、重複型や欠損型を含む新たな遺伝子型の存在を見出した。そこで、さらに詳細な日本人の *ORM* 遺伝子構造/多型の解析とともに、これらの AGP 発現や抗がん剤応答性への影響を明らかとすることにより、抗がん剤をはじめ AGP 結合性薬物の血中濃度の変動要因の解明、ならに有効性・副作用を考慮した個別化治療への応用も可能となり、临床上非常に有用であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、 α -1-acid glycoprotein (AGP) をコードする日本人の *ORM* 遺伝子構造の詳細を調べ、抗がん剤パクリタキセル (PTX) の薬物応答性 (薬物動態や有効性等) に影響する遺伝子型を同定し、これらの遺伝子診断法の確立ならびに臨床応用への可能性を目指した。さらに、各 *ORM* 遺伝子 (*ORM1* 及び *ORM2*) の発現調節領域の特定とともに、遺伝子多型による発現影響をインビトロ実験により行い、それらの生物学的意義についても明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、国立医薬品食品衛生研究所及び国立がん研究センターの研究倫理審査委員会の承認を得て、同センターにて PTX 療法を受けた日本人患者の生体試料及び臨床情報の供与を受けて実施した。

(1) 日本人癌患者の *ORM* 遺伝子多型解析

165 名の PTX 投与を受けた日本人癌患者由来の DNA 試料を用いて、*ORM* 遺伝子構造の解析ならびに遺伝子多型/ハプロタイプ解析を以下の手順にて行った。

ORM 遺伝子の重複・欠損の解析:

重複型の検出は、各 *ORM* 遺伝子 (*ORM1* 及び *ORM2*) に特異的となるよう、各エクソン 4 の 3' 側にフォワードプライマーを、同じく各エクソン 4 の 5' 側にリバースプライマーを設計し、ゲノム DNA を用いて PCR 増幅することにより、重複されている場合のみ増幅産物が見られる系を利用した。一方、欠損型の検出は、各 *ORM* 遺伝子の全長を増幅するように 5'-flanking 領域と 3'-flanking 領域に設計したプライマーを用いて PCR 反応を行い、増幅産物の有無および長さを判定して行った。

ORM 遺伝子多型解析:

重複または欠損を持たない単一縦列型 (*ORM1-ORM2*) の DNA 試料を用いて、各 *ORM* 遺伝子の全長 PCR 産物を用い、直接シーケンシング法により、一塩基多型 (SNP) 等の遺伝子多型を同定した。

連鎖不平衡及びハプロタイプ解析:

上記の解析でアレル頻度 3% 以上の SNP を用い、*ORM1* と *ORM2* の全長を通して連鎖不平衡解析ならびにハプロタイプ解析を行った。

(2) *ORM* 遺伝子型と血清 AGP 値及び PTX 薬物動態との相関

PTX 治療前の血清 AGP 値及び PTX (175-210 mg/m²) 投与 9 時間後までの PTX ならびにその代謝物 [C3'-p-hydroxy PTX (3'-p-OH-PTX)、6 α -hydroxy PTX (6 α -OH-PTX) 及び 6 α -C3'-p-dihydroxy PTX (di OH-PTX)] の血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) について、*ORM* 遺伝子型/多型との相関を解析した。AGP 値については患者背景因子を含む重回帰分析を実施した。

(3) *ORM* 発現調節領域及び多型による発現影響の解析

ORM 遺伝子の発現調節領域を特定するため、*ORM1* 遺伝子の転写開始点から約 1.1 kb

上流までの領域 (full length)、777b上流までの領域 (Del 1) 及び188b上流までの領域 (Del 2)と、これらの配列に対応する *ORM2* の各プロモーター領域を、それぞれルシフェラーゼレポーターベクターに組み込み、*ORM* ルシフェラーゼベクターを作製した。これらをHeLa細胞に導入し、定常(無処理)レベル、デキサメサゾン (DEX) 及びIL-1 処理によるレポーター活性を測定し、*ORM*遺伝子毎にDel 2の定常レベル(無処理の活性)に対する相対値を用いて評価した。

また *ORM1* 多型を full length ベクターに導入したアッセイ系にて、定常レベル及び DEX 処理による発現影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 日本人癌患者の *ORM* 遺伝子多型解析 *ORM* 遺伝子の重複・欠損の解析:

165名のDNA試料を用いて重複・欠損の有無を解析した結果、単一縦列型 (*ORM1-ORM2*)、*ORM1* 重複型および *ORM2* 重複型の頻度は、それぞれ0.685、0.309及び0.006であった。なお、本症例では何れの欠損型も検出されなかった。

ORM 遺伝子多型解析:

単一縦列型のDNA試料(113名)を用い、両遺伝子の全エクソン、近傍イントロン、およびプロモーター領域(約1kb)における遺伝子多型を解析した結果、*ORM1* には43種(新規17種)の多型、*ORM2* では40種(新規

15種)の多型が検出された(アレル頻度: 0.004~0.429)。このうち、アミノ酸置換をもたらす多型は、*ORM1* および *ORM2* でそれぞれ3種および2種(新規1種)、プロモーター領域の多型では13種(新規5種)及び14種(新規3種)であった。

ハプロタイプ解析:

上記の解析を基に、アレル頻度3%以上の32種のタグ多型を用いて、両遺伝子領域(*ORM1-ORM2*)を含むハプロタイプ解析を行った結果、41種のハプロタイプが同定された。また、アミノ酸置換を有する2種のタグ多型 [*ORM1* 113A>G (Q38R) 及び *ORM2* 421G>C (G141K)] を基に、4種のハプロタイプグループ、すなわち *I (タグ無し: 頻度 0.819)、*II [*ORM1* 113A>G (Q38R) を含む: 頻度 0.137]、*III [*ORM2* 421G>C (G141K) を含む: 頻度 0.035] ならびに *IV [*ORM1* 113A>G (Q38R) 及び *ORM2* 421G>C (G141K) を含む: 頻度 0.009] として分類した(図1)。

(2) *ORM* 遺伝子型と血清 AGP 値及び PTX 薬物動態との相関

ORM1 または *ORM2* の重複型患者の血清 AGP 値は、重複のない単一縦列型患者での値と比較して、有意な差は見られなかった。一方、単一縦列型患者において、*ORM1* の5'上流領域に存在する多型(*ORM1*-559T>A)及び *ORM2* のアミノ酸置換を伴う多型 [*ORM2* 421G>C (G141R)] を有する患者において、

Gene	<i>ORM1</i>														<i>ORM2</i>										N	Frequency													
	Region		5'flk		ex.1	inl.1	ex.2	inl.3	inl.4	inl.5	5'flk		inl.1	ex.4	inl.4	inl.5	3'-flk																						
Substitution of nucleotide (amino acid)		-1139G>A	-742G>A	-559T>A	-509T>C	-289T>C	113A>G (Q38R)	IVS1+108C>T	207C>T (F69F)	IVS3+60G>A	IVS4+35T>A	IVS4+212A>G	IVS5+58T>C	-1118G>A	-1016G>A	-688A>C	-616G>A	-559T>A	-540C>T	-509C>T	-386C>T	-289T>C	-155A>G	IVS1+146G>A	IVS1+13C>A	421G>C (G141R)	IVS4+33T>C	IVS4+76A>G	IVS5+38A>C	IVS5+34G>A	IVS5+203G>T	IVS5+48C>T	*122+202A>G						
Haplotype (group/subgroup/type)																																							
*I	*IA	*fa																																		92	0.407	0.407	
		*fb																																			27	0.184	
	*IB	*ff																																			5	0.022	0.226
		*fg																																			4	0.018	
		*fi																																			2	0.009	
		*fi?																																			1	0.004	
	*IC	*fi?																																			1	0.004	
		*fiw?																																			1	0.004	
		*fc																																			18	0.080	
		*fd																																			8	0.027	
		*fn																																			2	0.008	
		*fl																																			2	0.009	
	*IE	*fk																																			1	0.004	
		*fl																																			1	0.004	
*fl?																																				1	0.004		
*fw?																																				1	0.004		
*IM?	*fm?																																			5	0.022		
	*fv?																																			1	0.004		
*IN?	*fn?																																			1	0.004		
	*fp?																																			1	0.004		
*II	*IIA	*2a																																		2	0.011		
		*2b																																		4	0.019		
	*IIC	*2c																																		4	0.018		
		*2d																																		3	0.010		
	*IIE	*2f?																																		1	0.004		
		*2f?																																		1	0.004		
	*IIG	*2g																																		2	0.009		
		*2h?																																		2	0.009		
	*IIK?	*2m?																																			1	0.004	
		*2n?																																		1	0.004		
*III	*2k?																																			1	0.004		
	*2l?																																			1	0.004		
	*2a																																			3	0.013		
*IV	*2b																																			3	0.013		
	*2c																																			3	0.013		
*IV	*2a?																																			1	0.004		
																																		226	1.000	1.000			

図1 日本人癌患者の*ORM1-ORM2*ハプロタイプ

AGP 値の増加傾向が認められた($p = 0.07$ 及び $p = 0.19$, Mann-Whitney 検定)(図 2)。なお、両多型には連鎖不平衡が見られ ($|D'| = 0.885$, $r^2 = 0.395$)。両多型を含むハプロタイプ *III についても、AGP 値の増加傾向が認められた($p = 0.088$, Mann-Whitney 検定)。なお、*ORM1*-559T>A を遺伝子マーカーとして重回帰分析を行った場合も *ORM* 遺伝子型の寄与($p=0.0605$)が確認された(表 1)。

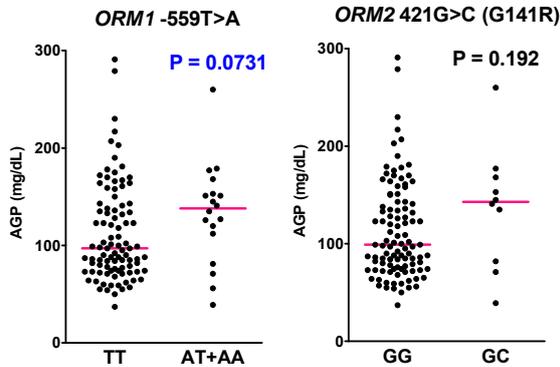


図2 日本人癌患者の*ORM*遺伝子多型と血清 α -酸性糖蛋白レベルとの関係

表1 日本人癌患者の血清 α -酸性糖蛋白レベルに関する重回帰分析

Independent Variables	Coefficient	SE	p
Intercept	2.364	0.1357	< 0.0001
PS (0 vs. 1,2)	0.081	0.0252	0.0018
CRP (mg/dL)	0.024	0.0047	< 0.0001
Neutrophil count	1.0×10^5	4.2×10^6	0.0164
Albumin (g/dL)	-0.136	0.0341	0.0001
<i>ORM1</i> -559T>A	0.056	0.0298	0.0605

Summary of analysis: $r^2 = 0.628$, $n = 113$.

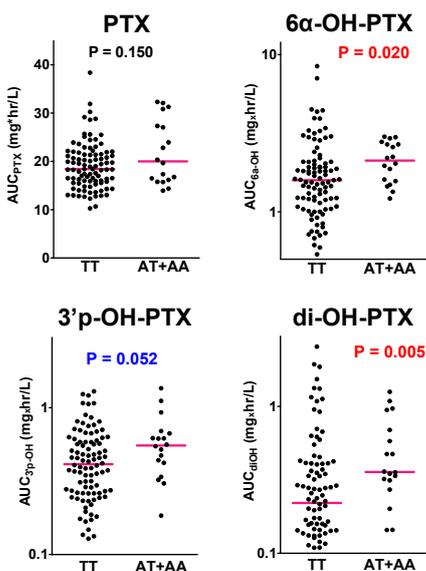


図3 日本人癌患者の*ORM1*-559T>A多型とPTX及びその代謝物の血中濃度-時間曲線下面積との関連

AGP 値への影響と一致して、PTX 及び代謝物の AUC 値に対して、*ORM* 遺伝子の重複による影響は見られなかった。なお、*ORM1*-559T>A 保持者では、PTX の AUC には影響が見られなかったが、PTX 代謝物の AUC 値上昇が認められた(図 3)。なお、これは、AGP が PTX の肝取り込みのキャリアーとして働いたことによるものと推測された。

(3) *ORM* 発現調節領域及び多型による発現影響の解析

げっ歯類の GRE 及び C/EBP 結合領域とホモロジーの高い配列 (転写開始点から 37 ~ 53b 上流) を含むプロモーター領域 (Del 2) を挿入したレポーターアッセイ系では、*ORM1* および *ORM2* ともに、DEX 処理による誘導 (1.4 ~ 1.6 倍) 及び DEX と IL-1 による相乗的活性上昇 (1.6 ~ 1.7 倍) が同様に認められた。*ORM1* と *ORM2* のホモロジーが高い (約 98%) 約 770b 上流までの領域を挿入したアッセイ系 (Del 1) では、両遺伝子ともに定常活性及び誘導因子による応答性は、Del 2 の活性と比較し約 60 ~ 80% に減少した。一方、full length (約 1.1kb) の定常活性は、*ORM1* では *ORM2* の約 2 倍の活性が見られ、さらに IL-1 処理により、*ORM1* において活性上昇が認められた。これに対し、*ORM2* の full length は Del 1 とほぼ同様の活性を示し、また IL-1 処理による上昇は認められなかった (図 4)。このことから、各 *ORM* 遺伝子のプロモーター上流域には近位の応答エレメントを修飾する配列が存在していることが示唆され、特に 770b ~ 1.1kb 上流における *ORM1* と *ORM2* の配列の違い (ホモロジー約 72%) が、両遺伝子の定常発現レベルの違いや、炎症時の誘導能にも影響している可能性が示唆された。

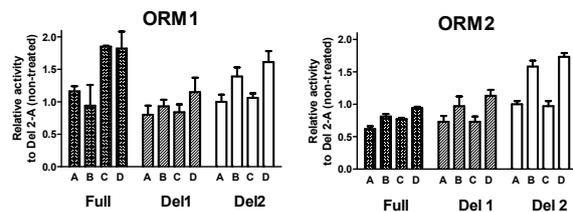


図4 長さの異なる*ORM*プロモーター領域を挿入したルシフェラーゼレポーター活性及び誘導因子による活性影響
A: 無処理, B: DEX処理, C: IL-1 β 処理, D: DEX+IL-1 β 処理

なお、*ORM1* 多型 (-559T>A) を *ORM1* full length ベクターに導入したところ、定常レベルの活性及び DEX による応答性に対して有意な影響は認められなかった。このことから、PTX 投与症例での AGP 値上昇は、本多型とリンクする多型が関与していた可能性も示

唆される。なお、本プロモーター多型とリンクする *ORM2* 421G>C (G141R)の保有者では、AGP 値の増加傾向 (図 2) と併行して、生存期間の短縮傾向も観察されたが (data not shown)、実際に本多型が翻訳後修飾や薬剤結合性にどのように影響するか等、その臨床的意義の考察には、さらに詳細な解析が必要である。

以上より、本研究では日本人における *ORM* 遺伝子 (*ORM1-ORM2*) の詳細なハプロタイプ構造を明らかとするとともに、AGP 値及び PTX 薬物動態と関連する *ORM* 遺伝子マーカーを同定した。さらに、*ORM* 発現・誘導に関わる新たなプロモーター上流配列の存在の可能性、特に *ORM1* 遺伝子に特有の発現調節機構の存在を示唆する知見が得られた。なお、さらに詳細な *ORM* 発現誘導機構の解明ならびに *ORM* 多型の臨床的意義については、今後の更なる検討が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Katori N, Sai K, Saito Y, Fukushima-Uesaka H, Kurose K, (fifteen other co-authors): Genetic variations of orosomucoid genes associated with serum alpha-1-acid glycoprotein level and the pharmacokinetics of paclitaxel in Japanese cancer patients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100, 4546-4559 (2011) 査読有

[学会発表](計2件)

香取典子、佐井君江、斎藤嘉朗、福島(上坂)浩美、黒瀬光一、(他12名): 日本人癌患者の *ORM* 遺伝子多型による血中 α -1-酸性糖蛋白レベルへの影響、日本薬物動態学会第25回年会、2010年10月7-9日、大宮ソニックシティ(埼玉)

香取典子、佐井君江、斎藤嘉朗、福島(上坂)浩美、黒瀬光一(他12名): パクリタキセル投与患者における α -1-acid glycoprotein と遺伝子多型、薬物動態および患者背景因子の関連性、日本薬学会第131年回、2011年3月29-31日、ツインメッセ静岡(静岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐井 君江 (SAI KIMIE)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・室長

研究者番号: 20195960

(2) 研究分担者

香取 典子 (KATORI NORIKO)

国立医薬品食品衛生研究所・薬品部・室長
研究者番号: 60142121

黒瀬 光一 (KUROSE KOICHI)

(2010-2011年度)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・室長

研究者番号: 30280754

斎藤 嘉朗 (SAITO YOSHIRO)

(2009年度)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・部長

研究者番号: 50215571