

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

課題番号				
71253 20000997A	臨床試験の予見性を高めるための、ヒト組織を用いた医薬品の安全性・有効性評価手法の確立に関する研究	大野 泰雄	……	1
72001 20001001A	日本におけるヒト肝細胞の保存・管理に関する基準の検討	小林 英司	……	10
72002 20001002A	日本人の肝及び腎の薬物排泄能の個人差と遺伝子多型	遠藤 仁	……	14
72003 20001004A	ヒト組織新鮮材料を用いた薬物の作用評価の研究 －産学共同のネットワーク作りをめざして－	松浦 成昭	……	21
72004 20000998A	高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物の有効性、安全性評価法の確立	永森 静志	……	25
72005 20001003A	ヒト薬物代謝酵素遺伝子多型簡易迅速定量法の臨床応用の新展開 －医薬品の適性使用と医療経済の効率化を目的として－	水柿 道直	……	29
72006 20001005A	臓器移植患者におけるP-糖蛋白質及びCYP3A4の定量的解析を基盤とした免疫抑制剤の適正使用法確立に関する研究	乾 賢一	……	39
72007 20001000A	エンドトキシン作用の種特異性の機構解明と、医薬品の有効性・安全性評価への応用に関する研究	棚元 憲一	……	45
72008 20000999A	肝移植により摘出された患者肝細胞の保存方法の確立と病的細胞の分子生物学的解析	香坂 隆夫	……	55

ヒト薬物代謝酵素遺伝子多型簡易迅速定量法の臨床応用の新展開－医薬品の適性使用と医療経済の効率化を目的として－

所属 東北大学医学部附属病院薬剤部

研究者 水柿道直

分担研究者

- | | |
|---------------------|------|
| (1) 東北大学医学部附属病院薬剤部 | 菱沼隆則 |
| (2) 東北大学医学部附属病院第3内科 | 大原秀一 |
| (3) 国立仙台病院消化器科 | 田所慶一 |
| (4) 東北大学医学部附属病院薬剤部 | 平塚真弘 |

要旨

対立遺伝子特異的増幅法と蛍光プローブ法を組み合わせることによって、約1時間半以内に薬剤反応性遺伝子のSNPの有無を判定することができる簡易迅速検出法を確立した。本法を患者の副作用回避および個々に適した投薬設計などに臨床応用した。

1. 研究目的

ある種の薬物を服用すると、効果が出やすい人と出にくい人がいたり、副作用が発現しやすい人たちが存在する。これは様々な薬物代謝酵素や薬物ターゲット分子遺伝子の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) に起因していることが報告されている。したがって、このような薬剤反応性遺伝子のSNP検出は、医薬品の重篤な副作用の発生や患者のQOLの低下を臨床レベルで未然に防ぐためにも非常に重要である。簡便、迅速、正確かつ汎用性の高い遺伝子多型解析システムが構築されれば、患者に対して適切な薬物の選択、必要最小限の投与量の設定が可能となり、医薬品の適正使用による患者のQOLの改善がはかられ、個人および国における経済的効果も非常に大きいと考えられる。また、治験の際に被検者の遺伝的背景を把握することにより、Poor Metabolizer (PM) を治験対象から事前に除外することができるので、より科学的に治験薬の安全性及び有効性を解析することが可能となる。本研究は、チトクローム P450 (CYP) に代表されるような薬物代謝酵素および薬物ターゲット分子遺伝子のSNP簡易迅速検出法の臨床応用を行うことにより、医薬品の適正使用をはかり、診療支援、副作用発現回避および医療経済に貢献するために立案した。前年度、報告者らは、対立遺伝子特異的増幅法と蛍光標識プローブ法を組み合わせることによって、検体(唾液あるいは血液)処理後、約2～3時間以内にPCR産物をリアルタイムで検出し、反応終了時点でSNPの有無を判定することができる薬物代謝酵素多型遺伝子簡易診断法を開発し、その臨床応用を試みている。今年度は、下記に示した点について研究を継続して行い、さらなる進展を収めたので報告する。

(1) Allele specific (AS) Real-Time PCR法を用いた薬剤反応性遺伝子SNPの簡易迅速検出

薬物代謝酵素 CYP2D6、DPYD および ADH2 の遺伝子多型 9 種と薬物ターゲット分子 CETP、ACE、 β 2AR、5-HT_{2A}R および INPP1 の 6 種を AS Real-Time PCR 法によって同時検出できる系を開発した。また、キャピラリー一式サーマルサイクラー (ロシュ社 LightCycler) を用いて、SNP 検出時間の短縮を試みた。

(2) ヘリコバクター・ピロリ除菌効率と CYP2C19 遺伝子多型の関連性の検討

現在プロトンポンプ阻害薬 (PPI) 内服治療法の対象疾患として、胃・十二指腸潰瘍、逆流性食道炎、*H.pylori* 除菌治療がある。*H.pylori* 除菌に関しては PPI・抗菌薬の併用投与により良好な成績が報告されている。近年 PPI の代謝は、その代謝酵素 CYP2C19 の遺伝子多型に影響を受ける事が明らかとされ、除菌成績が遺伝子型により異なるとの報告がなされた。CYP2C19 には exon5 あるいは exon4 上の 2 種の SNP が報告されており、それらの遺伝子型は、野生型の homozygous extensive metabolizer (homEM)、一方のアレルに SNP がみられる heterozygous extensive

metabolizer (hetEM)、両方のアレルに SNP のみられる poor metabolizer (PM) に分類されている。PM の頻度は、白人 (約 5%) に比べ日本人では高く約 15~20%と推定されている。現在内服療法が行われている PPI のうちオメプラゾールやランソプラゾールは、その大部分が肝の CYP2C19 によって代謝される事がわかっており、オメプラゾール内服時の血中濃度推移および一日の胃内 pH 推移において、CYP2C19 の遺伝子型に影響を受けることが明らかとなっている。今回我々は、PPI 代謝に関与する CYP2C19 遺伝子多型の解析を行い、(1) *H.pylori* 除菌の治療成績および(2)逆流性食道炎の治療成績に関して、その相関関係の検討を行った。

(3) NAT2 遺伝子多型検出によるイソニアジド投与患者の副作用発現回避

結核治療薬イソニアジドの N-アセチル化能の個人差も、ヒトにおける NAT-2 遺伝子の多型性によって引き起こされることが古くから知られている。NAT-2 はアセチル化活性により rapid acetylator (RA), intermediate acetylator (IA), slow acetylator (SA) に分類される。SA の頻度は白人種では約 50%であるのに対して、日本人では約 10%である。現在 10 種類以上の変異が見いだされているが、日本人では 3 種類の変異 (NAT2*5B, NAT2*6A, NAT2*7B) ではほぼ 100%の SA を説明できる。今回、イスコチン投与患者における副作用発現と NAT2 遺伝子多型に関する症例を経験し、それらを回避できたので報告する。

(4) 遺伝子診断によるオーダーメイド医療展開に向けてのパイロットスタディー

以下の症例について、副作用回避・適正投与量決定に関する研究を行った。

- ・結核患者におけるアミノグリコシド系抗生剤による難聴回避のためのミトコンドリア DNA 遺伝子診断
- ・急性リンパ性白血病患者におけるメルカプトプリン投与による副作用発現と TPMT 遺伝子多型の解析
- ・糖尿病患者における CYP2C9 遺伝子多型診断による経口糖尿病薬の適正投与量の設定

(5) LC/MS-MS を用いた超微量薬物動態解析

LC/MS による医薬品代謝体の超微量法を確立するために、まず、ロイコトリエン E4 (LTE4) を用いてその測定スキルの検討を行った。これは、投与薬剤の血中・尿中代謝体を定量することによって、個体毎の遺伝子多型によって生じる代謝異常を裏付けるとともに、上記診断法では明確な変異の同定が困難とされる CYP 分子種の変異に対し、分子種選択的な代謝を受ける化合物をモニター薬として投与し、その代謝体の生成量を比較することによって、代謝能の判定を可能とするシステムの基盤となるものである。

2. 研究方法

- ・ AS Real-Time PCR 法を用いた薬剤反応性遺伝子 SNP の簡易迅速検出

ABI PRISM 7700 を用いた SNP 診断

東北大学医学部倫理委員会より承認されたプロトコールに従い、同意の得られたボランティア 200 名の末梢血 200 μ l あるいは唾液 1 ml よりゲノム DNA を調製し、それを鋳型として、各薬剤反応性遺伝子の SNP (表 1) を検出できる対立遺伝子特異的増幅法のプライマーセットをそれぞれ設計した (表 2)。次にそれらの PCR 産物の配列内にハイブリダイズするような 5'端を 6-carboxyfluorescein (FAM) と呼ばれるレポーター蛍光色素、3'端を 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) と呼ばれるクエンチャー蛍光色素でラベルした TaqMan プローブを設計し (表 2)、対立遺伝子特異的増幅法と組み合わせて PCR 反応を行った。通常、TaqMan プローブ上の 2 種類の蛍光色素は、互いの物理的距離が近い場合、FRET (fluorescence resonance energy transfer) と呼ばれる現象によって蛍光強度が低下した状態におかれている。対立遺伝子特異的 PCR プライマーと鋳型 DNA が一致した場合は PCR 反応が進行し、TaqDNA ポリメラーゼの伸張反応によって蛍光標識プロローブが加水分解され、遊離したレポーター色素が蛍光を発する。検出にはアプライドバイオシステムズ社 ABI PRISM 7700 Sequence Detector を用いて、各サイクルごとの蛍光強度を測定することにより、PCR 産物を定量することを可能にした。反応条件は 50°C で 2 分間、95°C で 7 分間の変性後、95°C で 10 秒、60°C で 35 秒の反応を 35~40 サイクル行った。野生型ホモ接合体、ヘテロ接合体および変異型ホモ接合体の鑑別は、蛍光強度が検出可能になってくる PCR サイクル数 (Threshold cycle : Ct) を用いた。すなわち、反応終了後、得られたデータをコンピュータソフト「Sequence Detector」で解析し、野生型プライマーで得られた Ct 値 (Ctwt) から変異型プライマーで得られた Ct 値 (Ctmt) を差し引いた値により、変異の有

無を確認した。その大きさが-3 以下であれば野生型ホモ接合体、-3 から 3 の間であればヘテロ接合体、3 以上であれば変異型ホモ接合体であると判断した。また、TaqMan プローブは非常に高価なため、より安価な蛍光プローブとして SYBR Green でも検出可能か否かを検討した。

なお、CYP2D6 遺伝子に関しては、ホモロジーの高い他の遺伝子の非特異的増幅を避けるために、高速 PCR 用 DNA ポリメラーゼ・Z-Taq (TaKaRa)を用いた Long-PCR にて、CYP2D6 遺伝子領域を特異的に増幅した一次 PCR 産物を鋳型とした。また、CYP2D6*5 (遺伝子全欠損型) の検出も同様に高速 PCR 用 DNA ポリメラーゼ・Z-Taq を用いて、AS-Real Time PCR 法とは別に行った。

表 1. Single Nucleotide Polymorphisms in Drug-Metabolizing Enzyme and Drug Target Genes

薬物代謝酵素遺伝子	
CYP2D6	CYP2D6*4, CYP2D6*5, CYP2D6*10, CYP2D6*14, CYP2D6*18, CYP2D6*21
DPYD	DPYD*11, DPYD*12
ADH2	ADH2*2
薬剤ターゲット分子遺伝子	
CETP	Taq I B2
ACE	287bp Insertion
β 2AR	Arg16Gly, Gln27Glu
5-HT ₂ AR	T102C
INPP1	C973A

表 2. Primers and TaqMan Probes in the Present Study

CYP2D6 遺伝子特異的増幅用	
FW:	CCAGAAGGCTTTGCAGGCTTCA
RV:	ACTGAGCCCTGGGAGGTAGGTA
CYP2D6*5 (gene deletion) 検出用	
FW:	ACCGGGCACCTGTACTCCTCA
RV:	GCATGAGCTAAGGCACCCAGAC
CYP2D6*4 (G1846A)	
WT:	GCATCTCCCACCCCCAG
MT:	GCATCTCCCACCCCCAA
TM:	TCTCTGGACAAAGCCGTGAGCAACG
CM:	TGCAAATCCTGCTCTTCCGA
CYP2D6*10 (C100T)	
WT:	GCTGGGCTGCACGCTAG(C)C
MT:	GCTGGGCTGCACGCTAT(C)T
TM:	CGGGCTGGGCAACCTGCTGCAT
CM:	GCAGTATGGTGTGTTCTGGAAGTCC
CYP2D6*14 (G1758A)	
WT:	CCTTCGCCAACCACTCG(C)G

MT: CCTTCGCCAACCACTCG(C)A
 TM: AAGGGCACAAAGCGGGAAGCTGGGA
 CM: GAGGCGATCACGTTGCTCAC
 CYP2D6*18 (9 bp insertion)
 WT: CTTCTCGGTGCCCACTGGA
 MT: CTTCTCGGTGCCCACTGTG
 TM: TGCTCCCTAGCCAGAGGCTCTAATGTACAA
 CM: CCTCAACGTACCCCTGTCTCAA
 CYP2D6*21 (C2661 insertion)
 WT: CAGGTCTCGGGGGGI(G)C
 MT: CAGGTCTCGGGGGGA(G)G
 TM: TGGGTCCCAGGTCATCCTGTGCTCA
 CM: AGACTTGTCCAGGTGAACGCAGA
 DPYD*11 (G1003T)
 WT: CCATCGATACGGGGAGTCG
 MT: CCATCGATACGGGGAGTCT
 TM: TTGTACTTGGAGCTGGAGACACTGCCTTCG
 CM: AACGTAGAGCAGATGTTGCACAG
 DPYD*12 (G1156T)
 WT: GAGCTTGCTAAGGAAGAAAAGTGTG
 MT: GAGCTTGCTAAGGAAGAAAAGTGT
 TM: ATTTCTGCCATTCCCTGTCCCCACGGAA
 CM: GCATAGCAACAATTCTCCCACC
 ADH2*2 (Arg47His)
 WT: CACGTGGTCATCTGTGC
 MT: CACGTGGTCATCTGTGT
 TM: AGTGGTGGCTGTAGGAATCTG
 CM: TTCATGCTTCTCTTTATTCTG
 CETP Taq I B2 (G279A)
 B1: CCAGAATCACTGGGGTTCG
 B2: CCAGAATCACTGGGGTTCA
 TM: AGGTGACGGAGGCTCCATCACTGACTGT
 CM: AAGAGACTGGAGGCCAGAGAGG
 ACE 287bp Insertion
 I: GCTGGGATTACAGGCGTGATAC
 D: TTTCTCTAGACCCCCTGCTGCCTATAC
 TM: AGCTCCCCTTACAAGCAGAGGTGAGCTAAG
 CM: GGTTGAATGGCTTGAGCTCCA
 β 2AR Arg16Gly
 WT: CTTCTTGCTGGCACCCAAC(T)G
 MT: CTTCTTGCTGGCACCCAAC(T)A
 TM: TGGTGGGCATGGGCATCGTCAT
 CM: ATGGCCAGGACGATGAGAGA

β 2AR Gln27Glu

WT: ACCACGACGTCACGCAGC
MT: ACCACGACGTCACGCAGG
TM: TGGTGGGCATGGGCATCGTCAT
CM: ATGGCCAGGACGATGAGAGA

5-HT_{2A}R T102C

WT: ACCAGGCTCTACAGTAATGACTTTAACTT(C)T
MT: ACCAGGCTCTACAGTAATGACTTTAACTT(C)C
TM: AACCAACCTTTCCTGTGAAGGGTGCCTCTC
CM: TTCTCTAGGGACACTGCCATGAT

INPP1 C973A

WT: TGCTGCTCAGCCATACTA(G)C
MT: TGCTGCTCAGCCATACTA(G)A
TM: CCAGAAACAGGGCTTGATTTGCCACAG
CM: AGCACCCCTCATTTTCCACGT

WT; 野生型プライマー、MT; 変異型プライマー、TM; TaqMan プローブ、CM; 共通プライマー
下線部は-2 部位の人工的ミスマッチ導入塩基
括弧内は-2 部位のオリジナル塩基

LightCycler を用いた SNP 診断

ABI PRISM 7700 を用いた検出系を、LightCycler で行い、SNP 検出時間の短縮を図った。プライマーおよびプローブは同様の組み合わせを用いた。ただし TaqMan プローブを用いる時はアプライドバイオシステムズ社のキットを、SYBR Green を用いる時はロシュ社のキットを用いた。また、温度条件は反応終了まで約 30 分で終了するように設定した。

・ヘリコバクター・ピロリ除菌効率と CYP2C19 遺伝子多型の関連性の検討

H.pylori 除菌の治療成績

平成 7 年 6 月以降、PPI (オメプラゾールあるいはランソプラゾール) を用いた 2 剤 (PPI + アモキシシリン) または 3 剤 (PPI + クラリスロマイシン+アモキシシリン、 PPI +クラリスロマイシン + メトロニダゾール) による除菌治療を施行した患者計 160 例を対象とした。CYP2C19 遺伝子型については患者の同意のもと採血を行い、本プロジェクトにおいて分担研究者の平塚らが開発した AS Real-Time 法を用いて SNP を検出し、それぞれの遺伝子型を homEM、hetEM および PM に分類した。さらに、PPI の酸分泌抑制作用と胃粘膜萎縮との相関に着目し、胃粘膜萎縮の血清学的評価として血清 pepsinogen I / II 比を用い CYP2C19 遺伝子型との相関性も検討した。

逆流性食道炎の治療成績

内視鏡検査を行い、Los Angeles (LA)分類・ gradeA 以上の逆流性食道炎と診断された患者 41 例を対象とした。今回の検討に関しては、逆流性食道炎の維持療法期に用いられる PPI 半量 (ランソプラゾール 15mg/日) を投与を行い、4 週間および 8 週後に内視鏡検査を施行し治癒率を判定した。そのほか治癒率に影響を及ぼす可能性のある H.pylori 感染、胃粘膜萎縮、刺激酸分泌量を表す EGT と併せて評価した。

・ NAT2 遺伝子多型検出によるイソニアジド投与患者の副作用発現回避

<患者情報>

患者は、全身性エリテマトーデスと診断された 41 歳の男性である。免疫抑制作用のためプレドニゾン、プレド

ニゾロンの易感染防止のため週 2 回イソニアジドを投与された。また、酢酸トコフェロール、アスコルビン酸およびベラプロストナトリウムも補助的に投与された。薬物療法を開始後約 1 ヶ月を経過した際、イソニアジド投与日に限り 39℃台の発熱が出現した。副作用の発現は週 2 回で、朝の服薬後約 1 時間であった。薬物動態に影響を及ぼす肝機能および腎機能の指標となる AST、ALT、BUN には特に異常値は見いだされなかった。また、服用薬剤の薬学的管理の結果、重複投与、投与禁忌、慎重投与、相互作用などは認められなかった。

<SNP 検出>

本研究は東北大学医学部倫理委員会より承認されたプロトコールに則り、患者に十分な説明がなされ同意が得られた後行われた。ゲノム DNA は、末梢血 200 μ L より抽出した。抽出には、QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン) を用いた。NAT2 遺伝子多型の検出は、本研究プロジェクトにおいて、分担研究者である平塚らが開発した AS Real-Time PCR 法を用いた。

- ・ 遺伝子診断によるオーダーメイド医療展開に向けてのパイロットスタディー
 - ・ 結核患者におけるアミノグリコシド系抗生剤による感音性難聴回避のためのミトコンドリア DNA 遺伝子診断
 - ・ 急性リンパ性白血病患者におけるメルカプトプリン投与による副作用発現と TPMT 遺伝子多型の解析
 - ・ 糖尿病患者における CYP2C9 遺伝子多型診断による経口糖尿病薬の適正投与量の設定

上記に掲げた検討に関しては、共通の実験プロトコールを用いた。すなわち、同意が得られた患者の末梢血より QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン) を用いて、ゲノム DNA およびミトコンドリア DNA を抽出した。次に、本研究プロジェクトにおいて、分担研究者である平塚らが開発した AS Real-Time PCR 法を用い、ミトコンドリア DNA A1555 変異、TPMT*3C あるいは CYP2C9*3 の検出を行った。詳細なプロトコールについては、上記に記載した NAT2 の遺伝子診断と同様であるので割愛する。

- ・ LC/MS を用いた超微量薬物動態解析

LTE4 測定は、質量分析計に ESI (エレクトロスプレーイオン化) インターフェイスを装着した Quattro II (micromass)、HPLC 装置に Nanospace SI-1 (資生堂)を用いた LC/MS-MS 装置を使用した。

3. 研究成果

- ・ AS Real-Time PCR 法を用いた薬剤反応性遺伝子 SNP の簡易迅速検出

CYP2D6*10 の検出を例に説明する。まずはじめに、高速 PCR 用 DNA ポリメラーゼ・Z-Taq を用いて CYP2D6*5 が無いことを確認した。次に CYP2D6 遺伝子座を特異的に増幅し、得られた PCR 産物を 1000 倍希釈して AS Real-Time PCR による検出系の構築として反応を行った。その結果、横軸に PCR サイクル数、縦軸に蛍光シグナル (ΔRn) をとると、図 1 のようなプロファイルが得られた。ここで、FAM の蛍光強度を蛍光リファレンスである ROX によって補正した標準化蛍光シグナル (Rn) とする。 ΔRn はこの標準化蛍光シグナルから PCR 初期サイクルのレポーター蛍光シグナル (ベースライン) を差し引いた値である。さらにこのプロファイル上で、蛍光シグナルの増加を解析アルゴリズムが初めて検出したサイクル数を Ct とした。今回の検出では、すべての多型検出において ΔRn が 0.200 を越えた時のサイクル数を Ct とした。野生型ホモ接合体 (CYP2D6*1/*1)、ヘテロ接合体 (CYP2D6*1/*10) あるいは変異型ホモ接合体 (CYP2D6*10/*10) で、それぞれ特徴的なプロファイルが得られた。また、 $(Ct_{wt}-Ct_{mt})$ 値は野生型ホモ接合体、ヘテロ接合体及び変異型ホモ接合体の値に有意な差が認められた ($p < 0.001$)。従来法である PCR-RFLP 法により再確認した CYP2D6 の遺伝子型は、AS Real-Time PCR 法で得られた結果とすべて一致した。

上記の方法を用いて、CYP2D6、DPYD および ADH2 の遺伝子多型 9 種と薬剤ターゲット分子 CETP、ACE、 β 2AR、5-HT_{2A}R および INPP1 の 6 種の検出系を構築した。その結果、これらすべての検出において、反応温度条件を同一にできるプライマーおよび蛍光標識プローブのセットが設計できた。検出時に、PCR サイクルの増加に伴い、ミスマッチを持つプライマーによっても非特異的な増加が認められたものも存在したが、 $(Ct_{wt}-Ct_{mt})$ 値を計算す

ると、すべてにおいて野生型ホモ接合体、ヘテロ接合体あるいは変異型ホモ接合体の値に有意な差が認められた。これにより、ここにあげたすべての薬剤反応性遺伝子の SNP タイピングが可能となった。さらに、同方法は、唾液由来のDNAでも診断可能であった。また、TaqMan プローブをより安価な SYBR Green に置き換えた場合も同検出系は有効であった。

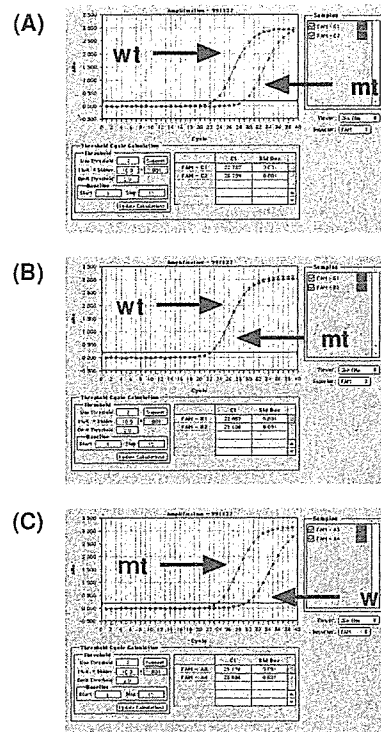


図1. Detection of the CYP2D6*10 alleles
(A); CYP2D6*1/*1
(B); CYP2D6*1/*10
(C); CYP2D6*10/*10
wt; 野生型プライマー、mt; 変異型プライマー

LightCycler を用いて検出時間の短縮を行った結果、ABI PRISM 7700 で検出可能であった TaqMan プローブを用いた反応は再現することができなかった。しかし、SYBR Green を用いた反応系においては CYP2D6*10、CYP2D6*14、CYP2D6*21 および INPP1(C973A)の SNP を約 30 分で検出できる系を構築することができた。

・ヘリコバクター・ピロリ除菌効率と CYP2C19 遺伝子多型の関連性の検討

H.pylori 除菌の治療成績

全患者の CYP2C19 遺伝子型は homEM57 例、hetEM73 例、PM30 例であった。遺伝子多型と除菌成績について、CYP2C19 で代謝されるオメプラゾールおよびランソプラゾールと、胃内 pH が抗菌力に大きな影響を与えるアモキシシリンの併用群では、失敗例は PPI の代謝が速い homEM 群 4 例であった。この失敗例を含めた homEM 群 15 例について詳細に検討したところ、失敗例では成功例に対し有意に体部胃炎の程度が少なく、胃粘膜萎縮の血清学的指標として血清 pepsinogen I / II 比が高い傾向が認められた。

逆流性食道炎の治療成績

homEM 群 18 例、hetEM 群 17 例、PM 群 6 例について、4 週後の治癒率は全体で 70.3% (hom58.8% het73.3% PM100%)であった。また、8 週後では全体の治癒率が 90.2%(homEM; 88.9%, hetEM; 88.2%, PM; 100%)であった。血清 pepsinogen I / II 比、血清 gastrin 値、EGT 値、H.pylori 感染の有無は治癒群・未治癒群の間では、CYP2C19 遺伝子型における有意差は認められなかった。

・ NAT2 遺伝子多型検出によるイソニアジド投与患者の副作用発現回避

Allele specific Real-Time PCR 法を用いて患者の NAT2 遺伝子型を解析した結果、野生型の遺伝子型が NAT2*4/*4 であるのに対し、患者の遺伝子型は NAT2*6A/*7B の変異型コンパウンドヘテロ接合体であった。また、従来法である PCR-RFLP によって再確認された患者の遺伝子型は、AS Real-Time PCR 法で示した結果と同一であった。これらの結果を基に、担当医、担当薬剤師及び報告者の間で、同薬剤を他剤に変更することとした。その後、患者の発熱は消失した。

・ 遺伝子診断によるオーダーメイド医療展開に向けてのパイロットスタディー

結核患者におけるアミノグリコシド系抗生剤による感音性難聴回避のためのミトコンドリア DNA 遺伝子診断

ミトコンドリアDNAの1555番目のAがGに変異しているタイプでは、ストレプトマイシンやゲンタマイシンなどのアミノグリコシド系抗生剤の投与により、不可逆的な感音性難聴になりやすいことが報告されている。結核患者などでストレプトマイシンを投与される患者に対して、あらかじめミトコンドリアDNAの遺伝子診断を行うことで、それら薬剤の副作用を回避することができると考えられる。そこで、我々はミトコンドリアDNA1555変異のリアルタイム検出系を構築し、同薬剤投与予定の入院患者に対して遺伝子診断を行った。現在までに、ミトコンドリアDNA1555変異を有している患者は見いだされていないが、今後も遺伝子診断を継続して患者の副作用回避を行う。

急性リンパ性白血病患者におけるメルカプトプリン投与による副作用発現とTPMT遺伝子多型の解析

急性白血病患者の緩解期にメルカプトプリンが投与されるが、同薬剤の副作用として、骨髄抑制や肝機能障害等が発現する症例がある。この原因は様々な因子が考えられているが、その中の一つとしてメルカプトプリンの代謝酵素であるチオプリンS-メチルトランスフェラーゼ (TPMT) の SNP により、酵素活性が減弱し、薬物血中濃度が上昇するためであることが示唆されている。今回我々は、日本人集団における TPMT のコモンミューテーションが TPMT*3C であることを見いだした。そこで、実際にメルカプトプリン投与患者で副作用が発現している症例において、TPMT の遺伝子診断を行っている。現在までに、当院でメルカプトプリンの副作用を発現している患者において、TPMT*3C の存在は確認されていない。しかし、これは代謝に影響を与える新規 SNP の存在を示唆するものであり、現在、同患者の TPMT 遺伝子の塩基配列を解析中である。

糖尿病患者における CYP2C9 遺伝子多型診断による経口糖尿病薬の適正投与量の設定

経口糖尿病薬トルブタミドは CYP2C9 によって代謝される。日本人集団に特徴的な SNP である CYP2C9*3 アレルは、酵素活性の低下をまねくが、日本人の約 25 人に 1 人はヘテロ接合体である。現在、我々はトルブタミド投与患者において CYP2C9 の遺伝子診断を行い、薬物血中濃度および治療効果との相関関係を解析している。

・ LC/MS を用いた超微量薬物動態解析

LTE4 および内部標準物質として用いた重水素標識 LTE4 (LTE4-d3) は 6.6 分付近にピークが観測され、妨害ピークは認められなかった。アトピー性皮膚炎 (AD) 患者、非 AD 患者及び健常人の尿中 LTE4 量を測定した。本研究では、対象とした全試料について LTE4 の検出・定量が可能であった。なお、LTE4 量は同一尿のクレアチニン含量により補正を行った。AD 患者の尿中 LTE4 量は平均 130 ± 106 pg/mg creatinine であり、健常人と同等の値を示す患者も存在するものの健常人尿中 LTE4 量の平均値である 60 ± 18 pg/mg creatinine に比べ有意に高値を示した ($p < 0.005$)。同様に、AD 以外の皮膚疾患患者の尿中 LTE4 量は 100 ± 40 pg/mg creatinine であり、健常人尿中 LTE4 量に比べ有意に高値を示した ($p < 0.05$)。一方、AD 患者及び AD 以外の皮膚疾患患者の尿中 LTE4 量の間には有意な差は認められなかった。

4. 考察

今回開発したリアルタイム SNP 検出法は煩雑な操作を必要とせず、短時間 (約 1.5 時間) で多量の検体を処理で

きる特徴があり、しかも唾液由来の DNA で診断可能という特異性の高さも認められた。従来の対立遺伝子特異的増幅法では、最終的な PCR 産物の量をゲル上で判定を下していたために反応条件の厳密な設定が不可欠で、反応条件のわずかな変動でも偽陽性が出る危険性があった。本法では、PCR の各サイクルで蛍光をモニターし、その増加を経時的に追いかけることで、より精度の高い遺伝子診断が可能である。また、電気泳動のような PCR 反応後の操作は一切不要なため、簡便であるのみならず、PCR につきものの交叉汚染の心配もない。反応終了後はチューブの蓋を開けることなく廃棄することができる。しかも、プライマー及びプローブの配列を工夫することにより、PCR の反応条件を同一にすることができたので、一度に複数の薬剤反応性遺伝子の SNP が検出可能である。つまり、DNA チップのような特性も有している。よって今後、遺伝子診断を臨床で応用する上で、それに耐えうるだけの迅速さと簡便さを有した非常に有益な診断法であると考えている。

また、臨床応用を行った例として CYP2C19 と NAT2 遺伝子多型と薬物療法の関係を示した。

H.pylori 除菌治療薬は、PPI と抗生剤の組み合わせで行われるが、抗生剤の中には抗菌力が胃内 pH の影響を受けるものが存在する。胃内 pH に影響を与える因子としては、PPI の効果および背景胃粘膜の酸分泌力が関与するものと考えられた。今後、除菌治療の成功率向上のためには CYP2C19 の遺伝子多型や背景胃粘膜に応じ、投薬量の変更を必要とできると考えられる。また、逆流性食道炎の治療成績に関しては、今回の検討において、Lansoprazole 投与による逆流性食道炎の治癒率に、CYP2C19 の遺伝子多型が関与する可能性が示唆された。また、維持療法期における PPI の半量投与において、8week 後の治癒率は約 90% の高値を示した。これは、対象群に grade A, B の軽症群が多く含まれていたことが原因と考えられた。また、今回は症例数が少ないため、従来報告されるような *H.pylori* 感染による治療成績の差は認められなかった。現在、PPI 常用量投与についても検討を行っており、今後は遺伝子情報を基にした患者個々に適した投薬量について検討する予定である。

次に NAT2 の遺伝子診断に関してであるが、イソニアジド投与における発熱発現の症例は、これまでに数十例報告されている。これは、イソニアジドに対する免疫反応を獲得するためであると予想されているが、詳細なメカニズムについては明らかになっていない。今回、イソニアジドによる発熱が観察された患者は、NAT2 遺伝子欠損者であり SA であることが予想された。同患者はイソニアジド血中濃度が高くなることで、免疫が獲得されやすかったことが示唆される。もし、NAT2 遺伝子多型とこのような副作用発現の関係が明確になれば、薬物療法開始前に NAT2 遺伝子多型を判定することにより、副作用の発現しやすい患者を推定することが可能となる。欧米では SA の頻度が約 50% と報告されているが、わが国では約 10% と少ない。しかし現在、結核治療や感染予防にイソニアジドは広く用いられているため、日本人でもその代謝酵素のジェノタイプピングは非常に重要であると言える。また近年、結核患者数が増加の傾向にあるため、イソニアジドを投薬される患者はますます増加し、SA に対する副作用防止の対策が必要となってくるであろう。

5. 結論

我々は、対立遺伝子特異的増幅法と蛍光プローブ法を組み合わせた方法で、微量の血液、唾液などを試料として、約 1 時間半で多種の薬剤反応性遺伝子の SNP を検出することができる方法を確立した。これにより、薬物代謝酵素および薬剤ターゲット分子の 15 遺伝子 29 SNP を同一温度条件で、簡易かつハイスループットに検出することができた。また、報告者は、この技術をイソニアジド投与患者の副作用発現回避や各種プロトンポンプ阻害剤投与患者のヘリコバクター・ピロリ除菌効率に関するスクリーニングスタディーなどに臨床応用している。将来的には、外来に通院する患者・入院患者に対して、薬剤反応性遺伝子の SNP 情報を ID カードにメモリーし、それらが適切な投与設計のための情報源となることを期待している。

6. 研究発表

1) Genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes and drug targets.

M. Hiratsuka, M. Mizugaki.

Mol. Genet. Metab., submitted for publication

- 2) Detection of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphisms using real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis with SYBR Green I on a GeneAmp5700.
M. Hiratsuka, Y. Kishikawa, K. Narahara, T. Inoue, S. I. Hamdy, Y. Agatsuma, Y. Tomioka, M. Mizugaki.
Anal. Biochem., 289: 300-303 (2001)
- 3) Increased urinary leukotriene E4 excretion in patients with atopic dermatitis.
T. Hishinuma, N. Suzuki, S. Aiba, H. Tagami, M. Mizugaki.
Br. J. Dermatol., 144: 19-23 (2001)
- 4) Detection assay of rare variants of thiopurine methyltransferase gene by PCR-RFLP using a mismatch primer in a Japanese population.
M. Hiratsuka, T. Inoue, F. Omori, Y. Agatsuma, M. Mizugaki.
Biol. Pharm. Bull., 23: 1090-1093 (2000)
- 5) High throughput detection of drug-metabolizing enzyme polymorphisms by allele-specific fluorogenic 5'nuclease chain reaction assay.
M. Hiratsuka, Y. Agatsuma, F. Omori, K. Narahara, T. Inoue, K. Kishikawa, M. Mizugaki.
Biol. Pharm. Bull., 23: 1131-1135 (2000)
- 6) Difference in urinary LTE4 and 11-dehydro-TXB2 excretion in asthmatic patients.
N. Suzuki, T. Hishinuma, F. Abe, K. Omata, S. Ito, M. Sugiyama, M. Mizugaki.
Prostaglandins Other Lipid Mediat., 62: 395-403 (2000)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社