

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

有害反応の回避を目指した副作用原因遺伝子の同定と
SNPの探索に関する研究

平成 13 年度総括分担研究報告書

主任研究者 千葉 寛

平成 14 年 (2002) 年 3 月

目次

I.	総括研究報告書 -----	1
	有害反応の回避を目指した副作用原因遺伝子の同定と SNP の探 索に関する研究	
	千葉 寛	
II.	分担研究報告 -----	9
1.	SNP の探索と機能解析 -----	11
	千葉 寛	
2.	薬剤誘起性 QT 延長症候群の遺伝子解析に関する研究 -----	19
	中村 祐輔	
	(資料) Polymorphism of LQTS genes in Japanese population	
3.	Stevens-Johnson 症候群の原因遺伝子と SNP の探索 -----	21
	白川 太郎	
4.	横紋筋融解症患者 DNA 試料採取ネットワークの確立と実施 --	23
	上田 志朗	
	(資料 1) 薬物誘起性横紋筋融解症の診断基準	
	(資料 2) 診断のためのフローチャート	
	(資料 3) 生命倫理審査申請書	
	(資料 4) 研究計画書	
	(資料 5) 研究へのご協力をお願い	
	(資料 6) 同意書	
5.	薬剤性 QT 延長症候群患者診断基準および検体収集ネットワー クの確立と実施に関する研究 -----	46
	岸田 浩	
	(資料)	
6.	DNA 試料収集の倫理面を含む方法論の確立と薬剤誘起性横紋筋 融解症患者診断基準及び検体収集ネットワークの確立と実施 ---	61
	埜中 征哉	
7.	Stevens-Johnson 症候群患者の診断基準と DNA 収集ネットワ ークの確立に関する研究 -----	64
	北村 啓次郎	

III	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	69
IV	研究成果の刊行物・別刷	-----	73

I 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

有害反応の回避を目指した副作用原因遺伝子の同定と SNP の探索

主任研究者：千葉 寛
千葉大学薬学研究院教授

研究要旨

本研究の目的は、1)薬物誘起性横紋筋融解症、2)薬物誘起性 QT 延長症候群、3)Stevens-Johnson 症候群)の原因遺伝子と SNP (single nucleotide polymorphism)を明かにし、これらの有害反応を未然に回避するための有効な方法を確認することにある。本年度はこれらの副作用を経験した患者の DNA 試料を収集する際の倫理問題への対応と各有害作用の診断基準の作成と検体収集ネットワークの確立を行うと同時に候補遺伝子 SNP の解析法の確立など患者試料解析のための基礎検討を行った。その結果、薬剤性横紋筋融解症については、診断基準を確立し、患者試料収集ネットワークを構築するとともに、VLCAD を始めとする候補遺伝子の解析方法を確立した。薬剤性 QT 延長症候群については、診断基準を作成すると共に、20 例の患者 DNA 試料を収集した。一方、心筋に発現しているイオンチャネルを中心に 89 個の SNP を見出し、うち 27 個はアミノ酸置換を伴うことを明らかにした。Stevens-Johnson 症候群については、患者試料収集ネットワークを構築すると共に診断基準を作成した。SNP 解析については未知遺伝子 SNP 検索技術の確立及び少数患者での予備検討を行った。本研究の進展により、重篤な副作用の発症に関連する遺伝子が同定され、予防と回避の道が開かれることが期待される。

分担研究者

埜中 征哉

国立精神・神経センター武蔵病院院長

中村祐輔

東京大学医科学研究所ゲノム解析センター
センター長・教授

北村啓次郎

雪谷皮膚科クリニック

白川太郎

京都大学大学院医学研究科教授

上田志朗

千葉大学薬学研究院教授

岸田 浩

日本医科大学教授

A. 研究目的

医薬品は有効性と有害作用の相反する二面性を有しており、現代の科学技術を持ってしても有害な面を全く持たない医薬品を創製することは困難である。このわずかに残された有害作用に一部の患者は敏感に反応し、予想できない反応を示し、死に至ることもある。本研究の目的は、このような有害反応の原因遺伝子と SNP (single nucleotide polymorphism)を明かにし、有害反応を未然

に回避するための有効な方法を確立することにある。そのための具体的な目標として、重篤な場合は死に至ることもある、1) 薬物誘起性横紋筋融解症 2) 薬物誘起性 QT 延長症候群、まれではあるが、致死率の高い全身性の皮膚障害を引き起こす 3) Stevens-Johnson 症候群 (皮膚・粘膜・眼症候群) を取り上げ、その原因となる遺伝子とその SNP を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

遺伝子解析チームと DNA 試料収集チームの連携により研究を遂行した。DNA 試料収集チームは 4 人の分担研究者からなる組織で、横紋筋融解症は上田、埜中が、QT 延長症候群は岸田が、Stevens-Johnson 症候群は北村が主に担当した。本年度は DNA 試料収集に伴う倫理問題への対応と各有害作用の診断基準、検体収集のネットワークの確立を行った。

遺伝子解析チームは HMGCoA 還元酵素阻害薬による横紋筋融解症 (千葉) 及び薬物誘起性 QT 延長症候群の SNP 及び機能解析 (中村)、及び Stevens-Johnson 症候群の原因遺伝子と SNP の探索 (白川) を担当し、本年度は解析法の検討を中心に患者試料解析のための基礎検討を行った。

なお、ヒトゲノム検体の収集と解析にあたっては「ヒトゲノム解析に関する共通指針」を遵守し、研究の遂行にあたっては倫理委員会の承認を得た後、提供者の同意を必ず得て行っている。また、研究対象者の不利益、危険性を可能な限り排除し、ゲノム情報及び個人情報情報を漏洩させない情報管理体制のもとで研究を遂行した。

C. 研究結果

1) 薬剤性横紋筋融解症

診断基準と倫理委員会申請のための書類

作成が終了し、千葉大学医学部付属病院とその関連病院、国立精神神経センター武蔵病院を中心に患者試料収集のためのネットワークを確立し、試料収集のための倫理委員会申請を行った。SNP 解析に関しては候補遺伝子である極長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ遺伝子 (VLCAD)、カルニチンパルミトイル転移酵素遺伝子の総ての既知 SNP に関する解析法を、HMGCoA 還元酵素阻害薬の体内動態関連遺伝子については CYP3A4、4 種、MPR1、3 種の SNP 解析法を確立した。一方、候補遺伝子の絞り込みのため原因不明のミオグロビン尿症患者 56 例を対象に VLCAD の抗体を用いた免疫染色を行い 2 例の完全欠損と 10 例の部分欠損例を見出した。

2) 薬剤性 QT 延長症候群

薬剤性 QT 延長症候群の診断基準の作成と症例の実体を明らかにするため、不整脈関係の専門医を中心に 102 施設 197 名にアンケート調査を実施した。この結果を基に薬剤性 QT 延長症候群の診断基準を作成すると共に、岡山大学の協力を得て 20 例の薬剤性 QT 延長症候群の患者から DNA 試料を収集した。

SNP 解析に関しては候補遺伝子である KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNA10, KCNA5, KCNAB1, KCNB1, KCND3, KCNIP2, KCNJ11, KCNK1, KCNK6, ABCC9, ADRB1, CACNA1C, SLC18A1, SLC18A2, SLC6A2 それぞれの蛋白をコードしている領域全てにプライマーを設計し、健常人 DNA 試料を PCR で増幅した後、SSCP 法にてスクリーニングを行った。異常バンドの検出されたサンプルについて、再度 PCR をかけ、ダイレクトシーケンシング法にて塩基配列を決定し、異常バンドを来した塩基変化を同定した。その結果、合計 89 個の SNP を同定した。

3) Stevens-Johnson 症候群

埼玉医大を中心に症例の再評価を行った。その結果 30 例の Stevens-Johnson 症候群／中毒性表皮壊死融解症の症例が抽出された。これらの症例について DNA 試料を収集するため説明書、同意書を作成し、埼玉医大倫理委員会に倫理審査を申請した。また、Stevens-Johnson 症候群研究大学グループ（愛媛大学、横浜市立大学、杏林大学等）の協力を得て Stevens-Johnson 症候群の診断基準を作成した。

SNP 解析については未知遺伝子 SNP 検索技術の確立及び少数患者での予備検討を行った。まず、マイクロサテライト法を用いて、全ゲノムについて Stevens-Johnson 症候群患者関連部位及び、肝臓の代謝酵素における SNP のスクリーニングを行い、臨床情報（重症度・家族歴、検査データ、使用薬剤）を整理・解析しデータベース化を行っている。現在までに、薬剤代謝酵素・トランスポーター領域で 5601SNPs、薬剤レセプター領域で 960SNPs が完了した。

D. 考察

1) 薬剤性横紋筋融解症

現在、HMGCoA 還元酵素阻害薬を服用患者で横紋筋融解症が疑われる高度の CPK 上昇を示した患者約 20 名がリストアップされており、これらの患者について倫理委員会の承認が得られ次第 DNA 試料の収集を開始する予定である。一方、原因不明のミオグロビン尿症患者の約 1/4 に VLCAD の完全あるいは部分欠損が認められたことから、VLCAD は薬剤性横紋筋融解症の有力な候補遺伝子と考えられた。33 種報告されている VLCAD の既知 SNP については総て解析法の確立が終了しており患者試料が集まり次第解析を開始する。

2) 薬剤性 QT 延長症候群

健常人に見出された候補遺伝子の 89 個の

SNP のうち、27 個はアミノ酸置換を伴うことから、遺伝子産物の機能修飾にかかわる可能性が高いと推定された。第 2 年度から前倒しでこれらの遺伝子の機能解析を始め、薬剤性 QT 延長症候群の原因となる候補遺伝子の絞りこみと、患者試料を用いた association study を行っていく予定である。

3) Stevens-Johnson 症候群

埼玉医大総合医療センターを中心に、Stevens-Johnson 症候群患者の会、Stevens-Johnson 症候群研究大学グループ（横浜市立大学、杏林大学、愛媛大学等）を通じて DNA 試料が除々に集まり始めている。一方、本研究で行う予定の SNP を用いたゲノムワイドな解析研究は諸についたばかりであり。本研究の遂行により、現時点では明らかになっていない Stevens-Johnson 症候群の発症、及び病態に関連する遺伝子が同定され、発症の予防への道が開かれることが期待される。

E. 結論

1) 薬剤性横紋筋融解症

千葉大学付属病院を中心とする千葉県下の主要病院と国立精神神経センターからなる患者試料収集ネットワークを構築した。一方、原因不明のミオグロビン尿症患者の約 1/4 に VLCAD の完全あるいは部分欠損を見出し、VLCAD が薬剤性横紋筋融解症の有力な候補遺伝子であることを明らかにした。患者試料が集まり次第 VLCAD を中心とした候補遺伝子の SNP 解析法開始する予定である。

2) 薬剤性 QT 延長症候群

薬剤性 QT 延長症候群の診断基準を作成すると共に、岡山大学の協力を得て 20 例の薬剤性 QT 延長症候群の患者について DNA 試料を収集した。一方、心筋に発現しているイオンチャネルを中心に 19 個の候補遺伝

子の SNP を健常人試料を対象に解析したところ 89 個の SNP が見出され、うち 27 個の SNP はアミノ酸置換を伴うものであった。第 2 年度からはこれらの変異の機能解析を行い候補遺伝子を絞り込むと共に患者試料を用いた association study を行っていく予定である。

3) Stevens-Johnson 症候群

埼玉医大総合医療センターと Stevens-Johnson 症候群研究大学グループ（横浜市立大学、杏林大学、愛媛大学等）を中心とした患者試料収集ネットワークを構築すると共に、Stevens-Johnson 症候群の診断基準を作成した。SNP 解析については未知遺伝子 SNP 検索技術の確立及び少数患者での予備検討を行った。本研究の進展により、スティーブン・ジョンソン症候群の発症、及び病態に関連する遺伝子が同定され、予防の道が開かれることが期待される。

F. 研究発表

書籍

CN Adra, X-Q Mao, P-S Gao, Xing Yang, T Shirakawa, J M Hopkin. Chromosome 11q13, Fe ϵ RI β and atopic asthma. Edited by S T Holgate. Karger., 20

雑誌

Senda C, Yamaura Y, Kobayashi K, Fujii H, Minami H, Sasaki Y, Igarashi T, Chiba K: Influence of CYP2D6*10 allele on the metabolism of mexiletine in human liver microsomes. Br J Clin Pharmacol 52:100-103, 2001

Kubota T, Chiba K: Frequencies of thiopurine S-methyltransferase mutant alleles (TPMT*2, 3A, 3B and *3C) in 151 Japanese subjects and inheritance of TPMT3C in a family of propositus. Br J Clin Pharmacol 51:475-477, 2001

Kobayashi K, Kogo M, Tani M, Shimada N, Ishizaki T, Numazawa S, Yoshida T, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Chiba K. The role of CYP2C19 in stereoselective hydroxylation of mephobarbital by human liver microsomes. Drug Metab Dispos 29: 36-40, 2001.

Hosokawa M, Suzuki K, Takahashi D, Mori M, Satoh T, Chiba K. Purification, molecular cloning and functional expression of dog liver microsomal acyl-CoA hydrolase: A member of the carboxylesterase multigene family. Arch Biochem Biophys 389:245-253, 2001

Taguchi M, Imaoka S, Yoshii K, Kobayashi K, Hosokawa M, Shimada N, Funae Y, Chiba K: Kinetics of testosterone 6 β -hydroxylation in the reconstituted system with the similar ratios of purified CYP3A4, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase and cytochrome b5 to human liver microsomes. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 109:53-63, 2001

Yasui-Furukori N, Kondo T, Kubota T, Otake H, Ohkubo T, Nagasaki T, Sugawara K, Chiba K, Otani K, Kaneko S: No correlations between the urinary ratio of 6 β -hydroxycortisol to free cortisol and pharmacokinetics of alprazolam. Eur J Clin Pharmacol 57:285-288, 2001.

Iwasa H, Kurabayashi M, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the Japanese population among six candidate genes for long QT syndrome. Journal of Human Genetics, 46:158-162, 2001.

Iwasa H, Kurabayashi M, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Genetic variations in five genes involved in the excitement of cardiomyocytes. Journal of Human Genetics, 46:549-552, 2001.

Donato JL, Ko J, Kutok JL, Cheng T, Shirakawa T, Mao XQ, Beach D, Scadden DT, Sayegh MH, Adra CN: Human HTm4 is a hematopoietic cell cycle regulator. *J. Clin. Invest.* 109:51-58, 2002.

Yuko Saitoh Y, Dake Y, Shimazu S, Sakoda T, Shibano A, Sogo S, Fujiki Y, Shirakawa T, Enomoto T: Month of Birth, Atopic Disease and Atopic Sensitisation. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 11:183-187, 2001

Fukunaga K, Asano K, Mao X-Q, Gao P-S, Roberts MH, Iwata M, Oguma T, Shiomi T, Kanazawa M, Adra CN, Shirakawa T, Hopkin JM, Yamaguchi K: Genetic polymorphisms of chemokine receptors CCR3 and CCR5 in Japanese and British asthmatics. *Eur. Respir. J.* 17:59-63, 2001.

Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, Tachikawa M, Many H, Nishino I, Nonaka I, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Endo T, Yoshikawa H, Toda T. Deficiency of alpha-dystroglycan in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res*

Commun. 291:1283-6, 2002

Tateyama M, Aoki M, Nishino I, Hayashi YK, Sekiguchi S, Shiga Y, Takahashi T, Onodera Y, Haginoya K, Kobayashi K, Iinuma K, Nonaka I, Arahata K, Itoyama Y. Mutation in the caveolin-3 gene causes a peculiar form of distal myopathy. *Neurology.* 58:323-5, 2002

Ikemoto-Tsuchiya K, Nishino I, Kawai M, Morimatsu M, Nonaka I. A new form of muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities. *Muscle Nerve.* 24:1710-1, 2001.

Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A, Murakami N, Hirano M, Nonaka I, Nishino I. Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct from Danon disease. *Neurology.* 57:903-5, 2001

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし
- H. 健康危険情報
なし

II 分担研究報告

一 薬物誘起性横紋筋融解症原因遺伝子と SNPs 及び薬物代謝酵素関連 SNP の探索と機能解析 一

分担研究者 千葉 寛 千葉大学薬学研究院遺伝子薬物学講座教授

研究要旨

近年薬物誘起性の横紋筋融解症が報告されているが、原因は未だに明らかになっていない。そのため、本研究においては、薬物による横紋筋融解症の原因遺伝子の探索を行うための基礎的検討として、本年度は、チトクローム P450 (CYP) 3A4、P-糖蛋白(MRP1)、極長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ(VLCAD)およびカルニチンパルミトイル転移酵素(CPTII)の遺伝子多型の検出法の確立を試みた。その結果、CYP3A4 においては4種、MRP1 においては3種、VLCAD においては33種、CPT II に関しては21種の変異の解析方法を確立する事が出来た。次年度は実際に HMG-CoA 還元酵素阻害剤を投与している患者の中で横紋筋融解症の発症した患者と発症しなかった患者について、上記の遺伝子変異について調べ、原因遺伝子の特定を行う予定である。

研究協力者

細川正清・千葉大学薬学研究院遺伝子薬物学
講座助教授

とが報告されている。この原因については不明であるが、何種類かの機序が考えられている。具体的には、筋細胞に対する酸素と栄養素の供給不足、過剰のエネルギー利用、代謝性毒物の産生、カリウムの喪失、筋に対する直接毒性作用等によると考えられるが、すべての患者で起こるわけではないので、遺伝的な原因についても考える必要がある。薬物以外では、過激な運動や外傷で起こることも報告されており、特に成人になってから突然起こる場合には、何らかの遺伝的変異が関与していることが示唆されている。この場合、普段は症状が現れないが、過激な運動などにより、初めて横紋筋融解症に特徴的な症状が現

A.研究目的

横紋筋融解症は横紋筋が傷害され、筋細胞が崩壊することによって、ミオグロビン(Mb)や、クレアチンホスホキナーゼ(CPK)等の筋細胞成分が流出し、筋症状、腎障害などを引き起こす代謝性の疾患で、筋肉痛、脱力感、CPK 上昇、血中および尿中ミオグロビン上昇を特徴とし、急激な腎機能悪化を伴い、重篤な場合は腎不全を発症することが知られている。横紋筋融解症は、薬物により起こるこ

れる。薬物による横紋筋融解症の発症機序についても、この場合と同様なことが考えられ、通常は症状が出ていないが薬物投与により初めて症状が現れる。この原因としては、恐らく遺伝的要因によるものと推定される。

現在、横紋筋融解症の原因と考えられている筋肉細胞における、酸素や栄養素の供給不足、過剰のエネルギー利用や代謝が原因となるエネルギーの低下、カリウムの喪失等について、原因となる酵素タンパクの遺伝子について、SNP の解析を行う。現在、エネルギーの低下としては解糖系酵素の欠損が知られているが、多くの場合疾患を伴うので別の経路について考え、特に脂肪酸の β 酸化系の酵素および脂肪酸の輸送に関わるタンパクについて SNPs 解析を行い、これらの酵素または輸送タンパクによるエネルギー産生の低下と薬物による作用の関係について明らかにする。とくに、上記タンパクはエネルギー産生系に関わる候補遺伝子としては、Fig 1 に示したように脂肪酸 β 酸化系の酵素の一つである極長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ、カルニチンパルミトイル転移酵素の他、変異によりエネルギー産生に影響を与えられ、

カルニチン輸送タンパク、アシル CoA 合成酵素等を考えている。このなかで、極長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼおよびカルニチンパルミトイル転移酵素に関しては複数の変異が報告されており、これらの変異が薬物による横紋筋融解症の原因になる可能性が考えられる。また、横紋筋融解症を起こす薬物の中で HMG-CoA レダクターゼ阻害剤には、コレステロールの合成阻害の他、細胞内ミトコンドリアの電子伝達系および酸化リン酸化に関与するユビキノンとヘム A の合成も阻害することも報告されている。これらのことから、薬物による横紋筋融解症の発症メカニズムとして、遺伝的要因と薬物の両方の原因によりエネルギー産生系が阻害されることが示唆された。

そこで、本年度は薬物による横紋筋融解症の発症の原因遺伝子を探索するための基礎的検討として、チトクローム P450 (CYP) 3A4、P-糖蛋白、極長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼおよびカルニチンパルミトイル転移酵素の遺伝子多型の検出法の確立を試みた。

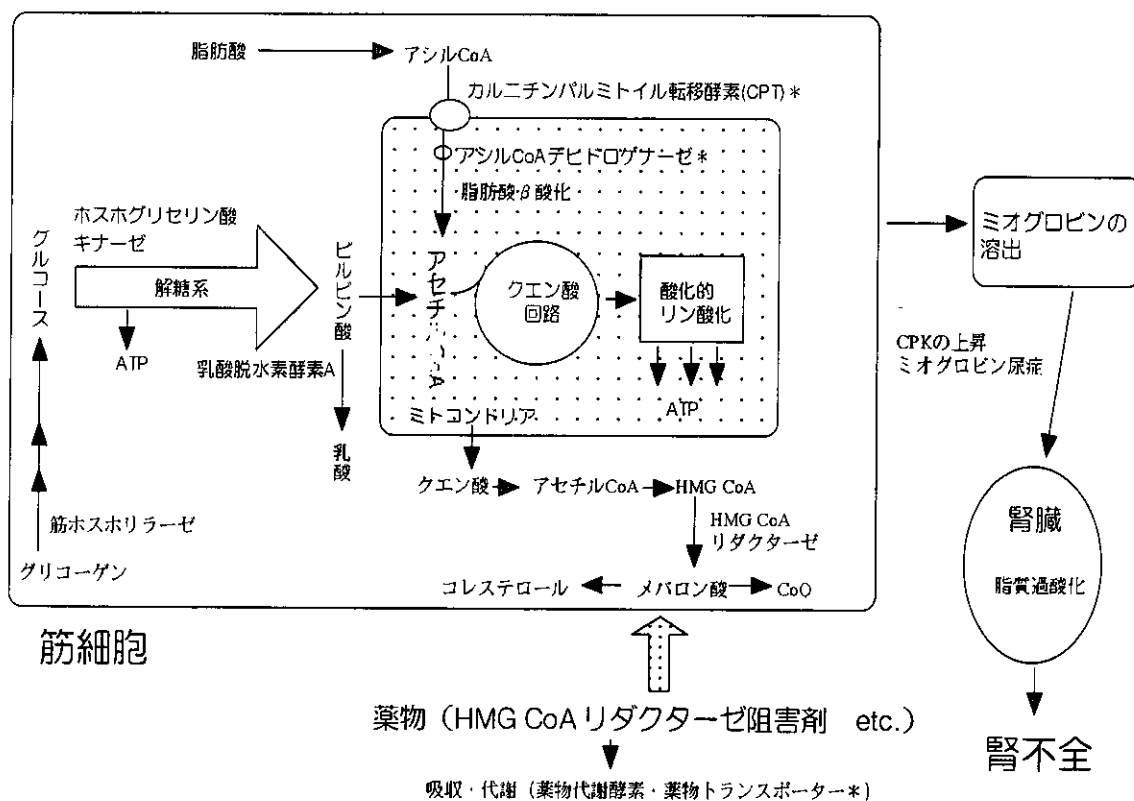


Fig.1 薬物誘起性横紋筋融解症の発症に関係があると考えられるタンパク

*は、今回 SNPs を解析した遺伝子がコードするタンパクを示している。

B.研究方法

ヒト末梢血は EDTA-2Na 抗凝固剤使用のベノジェクト真空採血管 7 mL (テルモ、東京) を用いて採血した。末梢血からのヒトゲノム DNA の抽出にはゲノム DNA 抽出キット GENOMIX-50 (バイオロジカ、Italy) を用いた。抽出後のヒトゲノム DNA 量およびその純度の確認は紫外可視分光光度計 DU-640 (BECMAN、東京) を用い、320、280、260 および 230nm の 4 波長の吸光度を測定することにより行った。

ヒト肝および小腸組織からのゲノム DNA

は、ヒト組織切片約 50 mg から DNA ZOL™ Reagent (GibcoBRL, Maryland, USA) を用いて抽出した。得られた DNA 沈殿を 200 μL の滅菌 MilliQ 水を用いて溶解し、フェノール-クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い沈殿を乾固させた後、約 50 μL の滅菌水に再溶解した。得られた DNA の定量および純度確認は、260 nm および 280 nm の吸光度を Ultrospec 4000 UV/Visible Spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) を用いて測定した。

PCR-RFLP 法で解析できない検体に関してはダイレクトシーケンス法により解析した。PCR 反応を行った後に得られた PCR

産物は、QIAquick™ PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) を用いてサンプル DNA を精製し、PCR プライマー除去を行った。シークエンスの解析は CEQ™2000 DNA Analysis System (BECKMAN, CA, USA) を用いて行った。

ヒト肝および小腸検体は、HAB 協議会付属霊長類機能研究所よりご供給されたものである。上記検体は、NDRI (National Disease Research Interchange) から移植不適合の肝臓を米国から輸入し、HAB 協議会 (千葉県白井市) の倫理委員会で事前に承認されたものである。C. 研究結果および考察

1. CYP3A4 の SNPs の解析

日本人健常人について CYP3A4*5 および *6 の頻度を調べた結果、0.30% および 0.34% であった。その他の変異遺伝子に関しては今回調べた日本人健常人からは検出されなかった。つぎにアメリカ人健常人について CYP3A4 *1B の頻度を調べた結果、10.9% であった。その他の変異遺伝子に関しては今回調べたアメリカ人からは検出されなかった。また、CYP3A4*6 を持つ場合の CYP3A4 のテストステロン 6β-水酸化活性は、野生型の平均の約 60% 程度の値を示し、CYP3A4*1B を持つ場合の CYP3A4 のテストステロン 6β-水酸化活性は、野生型の平均に対し 2 名が高く (約 3.3 倍、1.8 倍)、1 名は同程度、1 名は低い (約 4 分の 1) 値を示した。CYP3A4*5 はヒト末梢血から抽出されたゲノム DNA から検出されたため、活性についての検討はで

きなかった。

これらの結果から、今回検討した変異の頻度は極めて低く、また、今回みつかった CYP3A4*6 および CYP3A4*1B が活性に与える影響は少ないことが示唆された。CYP3A4 の個人差に対しては今回検討した遺伝子多型の影響は少ないと考えられた。しかしながら、これらの homozygote が存在した場合、あるいは活性に著しく影響を与える変異が新たに発見された場合には CYP3A4 の代謝能の低下により重篤な副作用が起こる可能性も考えられるため、今後も転写因子とともに新たな遺伝子多型の解析を進めていく必要はあるものと考えられた。

2. P-糖たんぱく (MDR1) の SNPs の解析

ヒト小腸検体から抽出した genome DNA を用いた検討により、ヒト MDR1 遺伝子の翻訳領域において遺伝子多型が存在することが確認された。また、遺伝子多型の解析に用いた 10 検体のヒト小腸検体のうち、Caucasian の 9 検体について、これら 3 種の遺伝子多型についての頻度解析をおこなったところ、これまでに文献に報告された Caucasian における頻度に対し比較的近い値が得られた。また、日本人における頻度とは明確な差異がみられなかったものの、African American における頻度とは明確な差異がみられた。これらのことより、ヒト MDR1 遺伝子の翻訳領域における遺伝子多型には、人種差が存在することが示唆された。また、これらの遺伝子変異は高頻度に連鎖している可能性が示唆された。

また、ヒト小腸検体を用いて mRNA 発現量を測定したところ、発現量には 100 倍以上の個人差がみられた。各検体において、遺伝子多型の結果と mRNA 発現量とを比較したところ、Exon 21 において、遺伝子多型による発現量の低下が確認された。また、Exon 12 においても発現量が低下する傾向がみられたが、Exon 26 については、遺伝子多型により発現量が上昇する傾向がみられた。これら遺伝子変異は高頻度に連鎖している可能性が示唆されたことから、これらの 3 種全ての変異をホモ接合体でもつ検体と全て野生型の検体との間で mRNA 発現量を比較したところ、全ての変異をもつ検体において mRNA 発現量が半減したことから、これらの変異により MDR1 mRNA の発現量は低下する可能性が示唆され

た。

以上のことより、ヒト *MDR1* 遺伝子の翻訳領域において遺伝子多型が存在することが確認された。また、今回見つかった変異は高頻度に連鎖するとともに、MDR1 mRNA 発現量の低下の原因となることが示唆された。しかし、mRNA の発現量の解析には転写調節領域の検討が必要であり、さらに翻訳領域における他の遺伝子多型の関与も考えられることから、今後、変異の連鎖を含め、詳細な検討をおこなうことが必要であると考えられる。

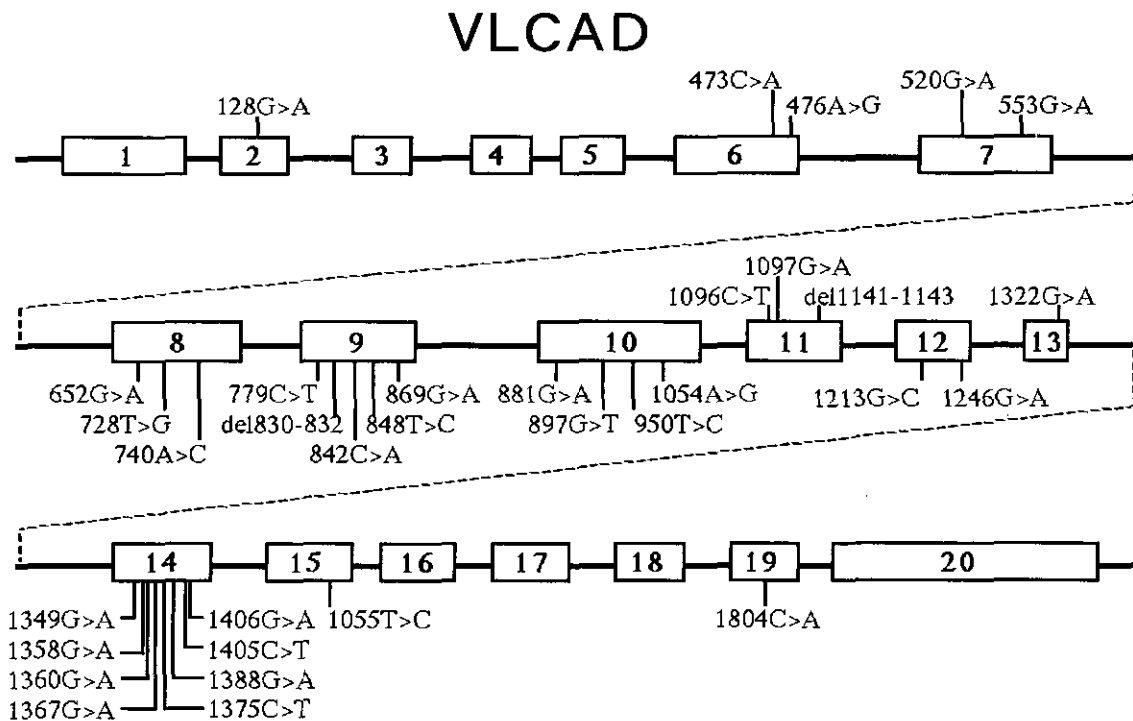


Fig.2 極長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ (VLCAD) 遺伝子の構造と遺伝子変位

3. 極長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼの遺伝子多型の解析

Fig 2 に示したように、極長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼは 20 個のエクソンから構成されている酵素である。本年度は、報告されている変異のなかで、アミノ酸置換または、アミノ酸の欠損または挿入を伴う遺伝子変異 33カ所について解析を行った(Fig. 2)。それぞれ、4名の健常人ボランティアのサンプルを用いて解析したところ、いずれの場合も野生型であった。

4. カルニチンパルミトイル転移酵素(CPTII)の遺伝子多型の解析

Fig. 3 に示したように、カルニチンパルミトイル転移酵素は 5 個のエクソンから構成されている。本酵素に関してもこれまで多くの変異が報告されているが、。本年度は、報告されている変異のなかで、アミノ酸置換または、アミノ酸の欠損または挿入を伴う遺伝子変異 21カ所について解析を行った。それぞれ、4名の健常人ボランティアのサンプルを用いて解析したところ、いずれの場合も野生型であった。

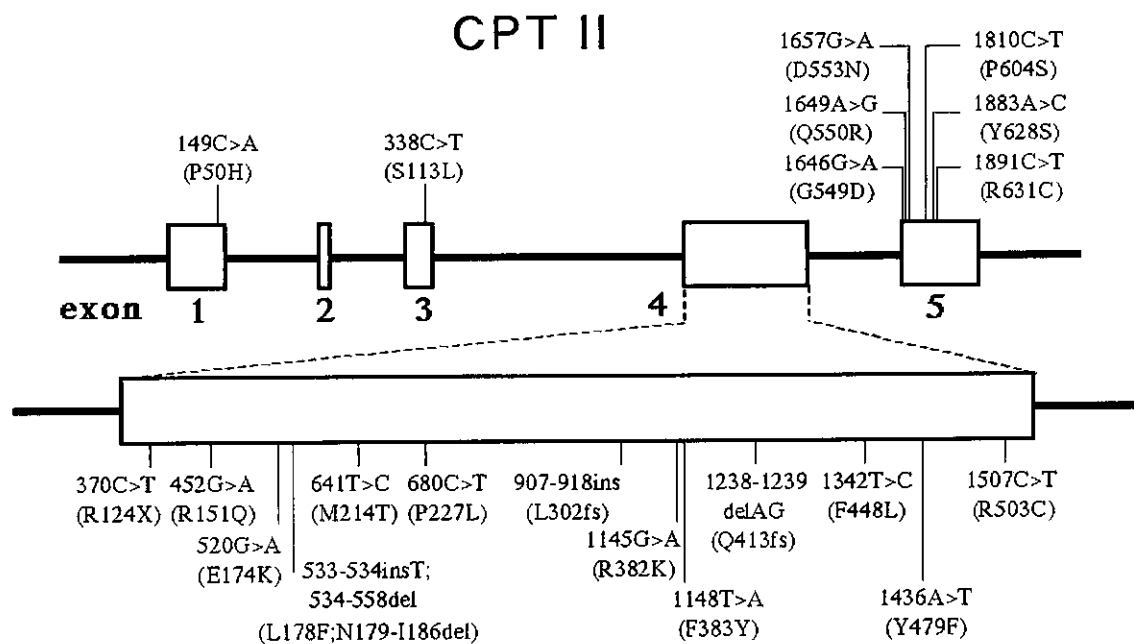


Fig. 3 カルニチンパルミトイル転移酵素(CPTII)遺伝子の構造と遺伝子変位

E. 結論

本研究においては、薬物による横紋筋融解症の原因遺伝子の探索を行うための基礎的検討として、チトクローム P450 (CYP) 3A4、P-糖蛋白(MRP1)、極長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ(VLCAD)およびカルニチンパルミトイル転移酵素(CPTII)の遺伝子多型の検出法の確立

を試みた。その結果、CYP3A4 においては4種、MRP1 においては3種、VLCAD においては3種、CPT II に関しては2種の変異の解析方法を確立する事が出来た。次年度は実際にHMG-CoA 還元酵素阻害剤を投与している患者の中で横紋筋融解症の発症した患者と発症しなかった患者について、上記の遺伝子変異について調べ、原因遺伝子の特定を行う予定である。

F.研究発表

1. 論文発表

Senda C, Yamaura Y, Kobayashi K, Fujii H, Minami H, Sasaki Y, Igarashi T, Chiba K. Influence of the CYP2D6*10 allele on the metabolism of mexiletine by human liver microsomes.
Br J Clin Pharmacol 2001;52(1):100-3

Kubota T, Chiba K. Frequencies of thiopurine S-methyltransferase mutant alleles (TPMT*2, *3A, *3B and *3C) in 151 healthy Japanese subjects and the inheritance of TPMT*3C in the family of a propositus.
Br J Clin Pharmacol 2001;51(5):475-7

Kobayashi K, Kogo M, Tani M, Shimada N, Ishizaki T, Numazawa S, Yoshida T, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Chiba K
Role of CYP2C19 in stereoselective hydroxylation of mephobarbital by human liver microsomes.
Drug Metab Dispos 2001;29(1):36-40

M.Hosokawa, K. Suzuki, D. Takahashi, M. Mori, T.Satoh and K. Chiba
Purification, molecular cloning and expression of dog liver microsomal acyl-CoA hydrolase: A member of the carboxylesterase multigene family.
Arch. Biochem. Biophys., 389, 245-253, 2001

M.Taguchi, S.Imaoka, K.Yoshii, K.Kobayashi, M.Hosokawa, N. Shimada, Y.Funae and K. Chiba, kinetics of testosterone 6b-hydroxylation in the reconstituted system with similar ratios of purified CYP3A4, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase and cytochrome B5 to human liver microsomes. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., 109, 53-63, 2001

N.Yasui-Furukori, T. Kondo, T.Kubota, H. Otake, T. Ohkubo, T. Nagasaki, K. Sugawara, K. Chiba, K. Otani, S. Kaneko No correlations between the urinary ratio of 6b-hydroxycortisol to free cortisol and pharmacokinetics of alprazolam
Eur. J. Clin. Pharmacol, 57, 285-288 (2001)

G.知的財産の出願状況

なし

H.健康危険情報

なし

分担研究報告書

薬剤誘起性QT延長症候群の遺伝子解析に関する研究

分担研究者 中村 祐輔

東京大学医科学研究所教授

研究要旨

病態が十分に明らかになっていない薬剤誘起性QT延長症候群の遺伝的背景を探るため、イオンチャネル遺伝子およびチャネルの機能を修飾すると思われる遺伝子計19ヶについて網羅的に一塩基多型を検索し、合わせて89ヶの多型を同定した。うち、27ヶはアミノ酸置換を伴うものであった。遺伝子面からのアプローチの方法をとった本研究が本疾患の病態解明の端緒となることが期待される。

A. 研究目的

QT延長症候群は心電図上QT時間の延長を特徴とした遺伝性疾患で、心室細動、Torsade de pointesなど血行動態を悪化させる心室性不整脈の生じる危険性が高くなり、失神発作さらには突然死の原因となるものである。家族性のものに関しては、1995年から1999年にかけて、6つ以上存在することが明らかになっている本疾患の原因遺伝子のうち5つが単離されたが、そのうちの4つは、カリウムチャネルをコードしている遺伝子であり(KCNQ1, KCNH2, minK, MRP)、残りの1つはナトリウムチャネル(SCN5A)をコードしていた。一方、薬剤誘起性QT延長症候群についても、数例の報告ではあるが上記遺伝子の一塩基多型(SNP, single nucleotide polymorphism)の関与が示唆されている。また、QT時間の延長には自律神経系のバランスも関与していると言われている。上記遺伝子及び、その他の心臓イオンチャネルもしくはチャネルの機能を修飾する役割を果たしていると思われる遺伝子のSNPを網羅的に検索することにより、薬剤誘起性QT延長症候群の遺伝的背景を探る端緒とするのが目的である。

B. 研究方法

1. SNPの検索

KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNA10, KCNA5, KCNAB1, KCNB1, KCND3, KCNIP2, KCNJ11, KCNK1, KCNK6, ABCC9, ADRB1, CACNA1C, SLC18A1, SLC18A2, SLC6A2 それぞれの蛋白をコードしている領域全てにプライマーを設計した。設計したプライマーを用いて、PCR+SSCP法にてスクリーニングを行った。

2. SNPの同定、確認

PCR+SSCP法にて異常バンドの検出されたサンプルについて、再度PCRをかけ、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定し、異常バンドを来した塩基変化を同定した。

C. 研究結果および考察

別表の通り、合計89ヶのSNPを同定した。うち、27ヶのSNPはアミノ酸置換を伴い、遺伝子産物の機能修飾にかかわる可能性が高いと思われた。アミノ酸置換を伴わないものについても、mRNAのスプラ

イシングや、発現量に影響を与える可能性があると考えられる。

D. 結論

家族性QT延長症候群の原因遺伝子のうち5つは単離され、ある程度の病態解明も進みつつある。一方、薬剤誘起性QT延長症候群に関しては、その多くが未解明のままである。遺伝子レベルからのアプローチの方法をとっている本研究が端緒となり、多型による機能の修飾が解明されることが期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Iwasa H, Kurabayashi M, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the Japanese population among six candidate genes for long QT syndrome. *Journal of Human Genetics*, 46:158-162, 2001.

Iwasa H, Kurabayashi M, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Genetic variations in five genes involved in the excitement of cardiomyocytes. *Journal of Human Genetics*, 46:549-552, 2001.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table. 1 Polymorphism of LQTS genes in Japanese population

Gene	Nucleotide change ^a	Amino acid change	Region	Frequency of minor allele	Number of chromosomes examined
KCNQ1	435C>T	I145I	Exon 3	0.06	100
	1110G>A	A370A	Exon 10	0.04	100
	1394-12C>T	intronic variant	Intron12	0.04	100
	1638G>A	S546S	Exon 15	0.28	100
	1685+23G>A	intronic variant	Intron15	0.04	100
	1732+43T>C	intronic variant	Intron16	0.23	100
	1927G>A	G643S	Exon 18	0.09	100
KCNH2	1467T>C	I489I	Exon 6	0.33	100
	1539T>G	F513F	Exon 6	0.28	100
	1692A>G	L564L	Exon 7	0.06	100
	1956T>C	Y652Y	Exon 8	0.12	98
	2690A>C	K697T	Exon 11	0.02	100
	2965+22A>G	intronic variant	Intron 12	0.22	100
	1673A>G	H558R	Exon 12	0.08	100
SCN5A	3269C>T	P1090L	Exon 18	0.04	100
	4299+53T>C	intronic variant	Intron 24	0.27	100
	5457C>T	D1819D	Exon 28	0.46	100
	5851G>T	V1951L	Exon 28	0.005	200
KCNE1	112A>G	S38G	Exon 1	0.19	98
	253G>A	D85N	Exon 1	0.02	100
KCNA10	348G>A	E116E	exon1	0.35	188
	399G>T	R133R	exon1	0.09	100
	658G>A	V330M	exon1	0.07	100
	741G>A	L247L	exon1	0.30	100
KCNA5	1149C>T	G383G	exon1	0.005	192
KCNAB1	348C>T	I127I	exon4	rare	192
	357+77G>A	intronic variant	intron4	rare	192
	525-63T>C	intronic variant	intron6	0.02	188
	525-50A>G	intronic variant	intron6	0.02	188
	658-57G>A	intronic variant	intron8	0.05	192
KCNB1	1071C>T	D357D	exon2	0.01	100
	768G>A	K256K	exon2	rare ^b	188
KCNB3	375G>A	P125P	exon1	0.22	100
	1106+15G>A	intronic variant	intron1	rare ^b	188
KCNIP2	1269+15C>A	intronic variant	intron2	0.22	100
	73+91C>A	intronic variant	intron1	0.23	100
	294+98C>T	intronic variant	intron3	0.11	192
	649-44T>C	intronic variant	intron7	0.49	100
KCNJ11	759+90C>A		3'UTR	0.01	192
	759+229C>G		3'UTR	rare	192
	67G>A	E23K	exon1	0.38	100
	570T>C	A190A	exon1	0.35	100
	1009A>G	I337V	exon1	0.38	100
KCNK1	nt(-17)(ins12)		5'UTR	0.47	100
	600C>T	A200A	exon2	0.01	100
KCNK6	-144G		5'UTR	0.03	190
	-63G>T		5'UTR	rare ^b	190
	294C>T	F98F	exon1	rare ^b	190
	449C>T	T150I	exon3	0.04	500
	576T>C	F192F	exon3	0.08	190
	718+9G>C	intronic variant	intron3	rare ^b	190
	719-10G>A	intronic variant	intron3	rare ^b	190
	775G>A	V259M	exon4	0.08	190
ABCC9	142+47C>T	intronic variant	intron1	rare ^b	188
	285-22G>T	intronic variant	intron2	0.03	100
	1012-59T>C	intronic variant	intron6	0.26	100
	1660-65C>T	intronic variant	intron11	0.26	100
	2397+58A>T	intronic variant	intron20	rare ^b	188
ADRB1	3561+4C>G	intronic variant	intron29	rare ^b	188
	4488T>C	F1496F	exon36	rare ^b	188
	145A>G	S49G	exon1	0.17	100
	1071C>T	R357R	exon1	0.02	100
CACNA1C	1165C>G	R389G	exon1	0.15	100
	522G>A	A174A	exon4	0.01	192
SLC18A1	966C>T	H322H	exon7	0.01	192
	1216+11G>A	intronic variant	intron8	0.10	192
	2437C>T	R813W	exon17	0.38	96
	2574G>A	S858S	exon19	0.01	96
	3846C>T	F1282F	exon30	0.46	96
	5363A>G	Q1788R	exon44	0.33	96
	5603C>T	P1868L	exon45	0.50	96
	5605A>G	M1869V	exon45	0.49	96
	10A>C	T4P	exon2	0.37	100
	31C>T	R11W	exon2	0.006	194
SLC18A2	293G>C	S98T	exon3	0.28	180
	407T>C	T136I	exon3	0.27	194
	447G>A	M149I	exon3	0.005	180
	489-14(insA)	intronic variant	intron4	0.09	192
	809A>T	D270L	exon7	0.005	196
	815G>C	A272P	exon7	0.005	196
	814+21A>C	intronic variant	intron7	0.36	180
	1065C>T	L355L	exon11	0.07	192
	1094+13G>A	intronic variant	intron11	0.06	190
	813+15T>C	intronic variant	intron6	0.30	100
SLC6A2	688A>T	M230L	exon6	0.070	300
	362G>A	A121Q	exon2	0.005	190
SLC6A2	1022+6A>T	intronic variant	intron6	rare ^b	188
	1287G>A	T429T	exon9	0.26	100
	1590+23T>C	intronic variant	intron11	0.04	188

^aNucleotide numbering starts from ATG start codon.^bRare indicated that it was not identified in normal controls.