

厚生労働科学研究費補助金

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 14 年度総括分担研究報告書

主任研究者 千葉 寛

平成 15 年 (2003) 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.	分担研究報告書 -----	9
1.	薬物誘起性横紋筋融解症原因 SNPs、薬物代謝酵素関連 SNP の 探索と機能解析 -----	11
	千葉 寛	
2.	横紋筋融解症患者 DNA 資料採取ネットワークの確立と実施 -----	20
	上田 志朗	
3.	HMG-CoA 還元酵素阻害剤による骨格筋障害機序に関する研究 -----	28
	埜中征哉	
4.	薬剤誘起性 Q T 延長症候群の遺伝子解析に関する研究 -----	30
	田中 敏博	
5.	薬剤性 QT 延長症候群 -----	32
	大江 透	
6.	薬剤誘起性 QT 延長症候群の遺伝子解析に関する研究 -----	34
	小川 聡	
7.	Stevens-Johnson 症候群の原因遺伝子の探索 -----	36
	白川 太郎	
8.	スティーブンスジョンソン症候群と toxic epidermal necrolysis (TEN) の診断基準の研究 -----	39
	橋本 公二	
9.	Stevens-Johnson 症候群 -----	44
	伊崎 誠一	
III	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	49
IV	研究成果の刊行物・別刷 -----	55

I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（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

千葉大学大学院・薬学研究院・教授

研究要旨

本研究班の目的は、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立することにある。初年度は、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。本年度は、DNA 試料収集を継続して行うと共に、集まった試料の解析を行い以下の結果を得た。即ち、薬剤性横紋筋融解症については、プラバスタチン及びアトルバスタチンにより横紋筋融解症をおこした患者に *MDR1*、と *OATP-C* の特定の SNPs が対照群に比較して多く認められることを明らかにした。特に、*OATP-C* の [T521C(V174A)] については *in vitro* 及び *in vivo* の検討により、薬物の輸送活性が著しく低下することから、プラバスタチンをはじめとする水溶性スタチンによる横紋筋融解症の原因の一つである可能性が強く示唆された。薬剤性 QT 延長症候群についてはピメノールにより QT 延長症候群を引き起こした患者に *KCNQ1* にアミノ酸置換を伴う SNPs のホモ接合体が見出され、薬剤性 QT 延長の原因 SNP である可能性が示唆された。Stevens-Johnson 症候群については理化学研究所で解析可能な薬剤応答遺伝子及びトランスポーターの 6825 SNPs 中の 350 について少数例の患者試料を対象に検討中である。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

上田志朗

千葉大学薬学研究院教授

埜中 征哉

国立精神・神経センター武蔵病院院長

田中敏博

理化学研究所遺伝子多型解析センターチーム

リーダー

大江 透

岡山大学大学院医歯学総合研究科教授

小川 聡

慶應義塾大学医学部内科学教授

白川太郎

京都大学大学院医学研究科教授

橋本公二

愛媛大学医学部皮膚科教授

伊崎誠一

埼玉医科大学総合医療センター皮膚科教授

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 5 人の分担研究者からなる組織で、横紋筋融解症は上田が、QT 延長症候群は大江と小川が、Stevens-Johnson 症候群は橋本と伊崎が担当した。

遺伝子解析チームは 5 人の分担研究者からなる組織で、HMGCoA 還元酵素阻害薬による横紋筋融解症の SNP 及び機能解析を千葉が、患者及びモデル動物の病理解析を埜中が、薬物誘起性 QT 延長症候群は田中が、Stevens-Johnson 症候群は白川が担当した。

ヒトゲノム検体の収集と解析にあたっては「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」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

った。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 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

a) 初年度に決定した薬剤性横紋筋融解症の診断基準を満たす患者から得た DNA 試料 8 例のうち、プラバスタチン及びアトルバスタチンの服用患者試料 4 例とプラバスタチン及びアトルバスタチンにより横紋筋融解症様症状をおこさなかったコントロール患者 9 例について、先天性横紋筋融解症の原因遺伝子 (*CPT II*, *VLCAD*, *PYGM*, *LDHA*)、薬物動態関連遺伝子 (*MDR1*, *MRP2*, *OATP-C*, *CYP3A4*) の 149 の SNPs について解析を行った。その結果、先天性横紋筋融解症の原因遺伝子については患者群で有意に多い遺伝子と SNPs は見出されなかったが、*MDR1* と *OATP-C* に患者群に多く認められる SNPs が見出された。

MDR1 に関しては exon 21 の G2677T/A (A893T) が、横紋筋融解症発症患者ではアレル頻度が 37.5% と高頻度であったが、発症しなかったコントロール群では、6.0% と両群間で大きな差が認められた。

一方、*OATP-C* の場合、A388G (N130D) の変異のアレル頻度が 100% と著しく高頻度なのに対し、コントロール群では 66.5% となっており、この変異に関しても両群間で差が見られた。また、T521C (V174A) に関しても横紋筋融解症発症患者では 62.5% に対しコントロール群では 5.5% と著しい差異が認められた。また、今回症例 3 でみられた C1007G は、コントロール群では全く見られず、さらにこの変異の日本人における頻度が 1.2% と極めて低いことから、この変異に関しても横紋筋融解症の原因となる可能性が考えられた。

次に、横紋筋融解症発症患者で高頻度のみ

られた A388G と T521C の変異を導入した *OATP-C* 遺伝子を HEK293 細胞に発現させ機能解析を行った。その結果、estradiol 17 β -glucuronide を基質に用いた場合、estrone 3-sulfate を基質に用いた場合のいずれにおいても、基質の取り込み速度は二つの変異の導入により著しく低下した。また、*OATP-C* の取り込み活性についてプラバスタチンによる阻害を調べたところ、阻害が認められたことから、プラバスタチンは *OATP-C* の基質となり得ることが強く示唆され、*OATP-C* 遺伝子の変異がプラバスタチンによる横紋筋融解症の原因の一つであることが考えられた。

さらに、T521C (V104A) の変異をホモで持つ個体 (n = 1) とヘテロで持つ個体 (n = 9) を対象にプラバスタチンを投与し、体内動態を変異を持たない個体 (n = 4) と比較したところ、ホモの個体ではプラバスタチンの非腎クリアランスがこの変異を持たない群と比較して約 1/6 に低下しており、ヘテロでは約 1/2 に低下している事が明らかとなった。

b) 薬剤性横紋筋融解症の病理変化

セリバスタチンにより 300~1000 IU/l 程度の高 CK 血症が数ヶ月にわたり持続した 54 才の高脂血症患者の上腕二頭筋より筋生検を行い、各種組織化学染色を行った。また、HMG-CoA 還元酵素阻害剤の筋障害機序を明らかにするためにラットにセリバスタチン 2 mg/kg/day を投与し、骨格筋を各種組織化学及び電顕により検討した。

その結果、患者上腕二頭筋には、組織学的に壊死・再生線維はなく、むしろ筋原線維の配列の乱れが目立ち、NADH-TR で筋線維内の局所的な濃染を伴う筋線維が散見された。また、ネマリン小体を伴う筋線維も認められた。筋ジストロフィーで頻繁に認められる過収縮線維は認めなかった。セリバスタチン投与ラットの骨格筋でも同様に、NADH-TR で筋原線維の配列の乱れと筋線維内の局所的な濃染を

伴う筋線維が散見された。電顕では、自己貪食空胞が多数認められ、筋線維崩壊に伴ってライソゾーム系も活性化されていることが明らかとなった。

2) 薬剤性 QT 延長症候群

2 次性 QT 延長症候群と診断され、研究に同意をされた患者さんのゲノム DNA サンプル 11 例を用いて、KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, KCNA10 遺伝子で同定されているアミノ酸変化を伴う SNP 計 12 ヶについて解析を行った。

その結果、ピメノールにより著しい QT 延長を引き起こした症例で、KCNQ1 遺伝子のアミノ酸バリエーションがホモ接合体となっており、健常人でのアレル頻度が 0.09 であることを考えると興味深い結果が見出された。他の SNPs に関しては、症例数が少ないこともあり、統計学的に有意差は認めなかった。

3) Stevens-Johnson 症候群

2002 年 12 月 11 日現在、理化学研究所で解析可能な薬剤応答遺伝子及びトランスポーターはゲノムサイズで 7333.5Kb であり、そのうち SNPs は 6825 である。これらの SNPs のうち 350 を 14 例の患者試料について検討中である。

D. 考察

1) 薬剤性横紋筋融解症

今回検討を行った先天性横紋筋融解症の原因遺伝子の SNPs はいずれも HMG-CoA 還元酵素阻害薬により横紋筋融解症をおこした患者には見出されなかった。しかし、HMG-CoA 還元酵素阻害薬の動態に関わるトランスポーター及び代謝酵素遺伝子の内、*MDR1* と *OATP-C* に患者群に多く認められる SNPs が見出された。特に、*OATP-C* の変異 [T521C(V174A)] については *in vitro* 及び *in vivo* の検討により、薬物輸送活性が著しく低下することが明らかとなったことから、プラバスタチンを

はじめとする水溶性スタチンによる横紋筋融解症の原因の一つである可能性が強く示唆された。実際、協力研究者の家入らの検討結果によれば[T521C(V174A)]の変異をホモで持つ個体(健常成人)は経口投与後のプラバスタチンの最高血漿中濃度はこの変異を持たない個体(健常成人)の3.5倍になっており、この変異を持つ患者が高濃度のスタチンに継続的に被曝することが、横紋筋融解症発症の原因の一つとなったものと考えられる。

しかし、今回検討を行った患者中で[T521C(V174A)]をホモで持つ個体は4例中1例であり、他はヘテロであったことから、横紋筋融解症の発症には他の要因も関与しているものと推測される。今後、OATP-C以外でスタチンの肝への取り込みを行っている可能性があるトランスポーターのSNPs解析を進めると共に、プラバスタチンとアトルバスタチンにより横紋筋融解症をおこした患者を中心に症例を増やす予定である。また、OATP-Cの[T521C(V174A)]に加えて[C1007G(P336R)]について、MDR1に関してはG2677T/A(A893T)についても機能解析を続け横紋筋融解症との関係を明らかにしていきたい。

2) 薬剤性QT延長症候群

家族性QT延長症候群の原因遺伝子のうち6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。

今回の検討では、ピメノールによりQT延長症候群を引き起こした1例でKCNQ1に比較的まれなSNPsのホモ接合体が見出された。此の変異については来年度に機能解析を行い、QT延長症候群との関係を明らかにしていく予定である。また、今回は症例数が十分でないため、患者で見出された他の変異が対照群と比較して有意に高い頻度か否かについては判定できなかった。しかし、来年度は国立循環器センターが患者試料の収集に加わると

ともに、今年度慶応でリストアップされたがまだDNA試料を採取していない患者が多く残っているため、これらの患者試料の解析を進めることにより患者群で高い頻度で見られる新たなSNPsが見出されることが期待される。

3) Stevens-Johnson症候群

埼玉医大総合医療センター、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)を通じて最終的に50例の患者試料を収集し、現在解析中のSNPsに加えて可能な限り多くのSNPsをゲノムワイドに解析する予定である。

E. 結論

1) 薬剤性横紋筋融解症

プラバスタチン及びアトルバスタチンにより横紋筋融解症をおこした患者にはMDR1、とOATP-Cの特定のSNPsが対照群と比較して多く認められた。特に、OATP-Cの[T521C(V174A)]についてはin vitro及びin vivoの検討により、薬物の輸送活性が著しく低下することが明らかとなったことから、プラバスタチンをはじめとする水溶性スタチンによる横紋筋融解症の原因の一つである可能性が強く示唆された。

2) 薬剤性QT延長症候群

ピメノールによりQT延長症候群を引き起こした症例でKCNQ1にアミノ酸置換を伴うSNPsのホモ接合体が見出され、薬剤性QT延長の原因SNPである可能性が示唆された。来年度以降の機能解析によりこのSNPとQT延長症候群との関係を明らかにしていく。

3) Stevens-Johnson症候群

今回行った少数例の解析結果をもとに来年度はゲノムワイドのSNP解析を行う。

F. 研究発表

Shiraishi T, Hosokawa M, Kobayashi K, Tainaka H, Yamaura Y, Taguchi M, Chiba K. Effects of G169R and P34S substitutions produced by mutations of CYP2D6*14 on the functional properties of CYP2D6 expressed in V79 cells. *Drug Metab Dispos.* (2002) 30: 1201-5.

Mitsunaga Y, Kubota T, Ishiguro A, Yamada Y, Sasaki H, Chiba K, Iga T. Frequent occurrence of CYP2D6*10 duplication allele in a Japanese population. *Mutat Res.* (2002) 505: 83-5.

Kobayashi K, Urashima K, Shimada N, Chiba K. Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat. *Biochem Pharmacol.* (2002) 63: 889-96.

Iwahori, T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, Suzuki T CYP3A4 inducible model for *in vitro* analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver *Hepatology*, (2003) 37, 665-673

Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, Oya Y, Nagata T, Chida K, Takahashi T, Takusa Y, Ohi T, Nishimiya J, Sunohara N, Ciafaloni E, Kawai M, Aoki M, Nonaka I. Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology* 59: 1689-1693, 2002. (selected for the Editorial)

Ishikawa H, Sugie K, Murayama K, Ito M, Minami N, Nishino I, Nonaka I. Ullrich disease: Collagen VI deficiency. EM suggests a new basis for muscular weakness. *Neurology* 59: 920-923, 2002. (selected for

Highlight)

Iwasa H, Kurabayashi M, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Twenty single-nucleotide polymorphisms in four genes encoding cardiac ion channels. *Journal of Human Genetics* 47:208-212, 2002.

Shimizu W, Noda T, Takaki H, Kurita T, Nagaya N, Satomi K, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Sunagawa K, Echigo S, Nakamura K, Ohe T, Towbin JA, Napolitano C, Priori SG. Epinephrine unmasks latent mutation carriers with LQT1 form of congenital long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:633-42.

Kiyahara C, Otsu A, Shirakawa T, Fukuda S, Hopkin JM. Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility.

Lung Cancer 37;241-256:2002.

Bottono N, Mao XQ, Borgiani P, Saccucci P, Stefanini L, Greco E, Fontana L, Shirakawa T, Hopkin JM. Low molecular weight PTP-IL-4RA interaction in atopy predisposition.

Allergy 75suppl7;210-12:2002.

Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y, Akaiwa M, Mao XQ, Enomoto T, Dake Y, Shimazu S, Yamashita T, Sugawara N, Brodeur S, Geha R, Puri RK, Sayegh MH, Adra CN, Hamasaki N, Hopkin JM, Shitakawa T, Izuhara K Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma.

*J Allergy Clin Immunol*109;980-987:2002.

Bottini N, Borgiani P, Otsu A, Saccucci P, Stefanini L, Greco E, Fontana L, Hopkin J, Mao XQ, Shirakawa T. IL-4 receptor alpha chain genetic polymorphism and total IgE levels in the

English population: two-locus haplotypes are more informative than individual SNPs.

Clin Genet. 61;288-292:2002.

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.

Ouchi K, Suzuki Y, Shirakawa T, Kishi F. Polymorphism of SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene confers susceptibility to Kawasaki disease. J Infect Dis. 187(2): 326-9:2003.

Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: Differential effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation J Invest Dermatol 119: 1231-1236, 2002

Sayama K, Yamasaki K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Ijuin T, Takenawa T, Hashimoto K.: Phosphatidylinositol 3 kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes. J Biol Chem. 277:40390-40396, 2002

須磨升美、櫻根純子、谷口龍生、久米昭廣、東 禹彦、藤川純子、藤山幹子、橋本公二：重症度に大きな違いのみられた Hypersensitivity syndrome の2例。日本皮膚アレルギー学会誌 10:51-55, 2002

飯尾健司、鈴木寛丈、末木博彦、飯島正文、

藤山幹子、橋本公二：臨床的に Hypersensitivity syndrome を疑ったが、HHV-6 の再活性化の認められなかったアレピアチンによる薬疹の1例。日本皮膚アレルギー学会誌 10:56-60, 2002

永井寛、藤山幹子、橋本公二：塩酸ロキサチジンアセタートによる苔癬型薬疹。皮膚病診療 25:173-176, 2003

藤山幹子、橋本公二：Drug-induced hypersensitivity syndrome Visual Dermatology 1:307-313, 2002

川久保 洋、薬物代謝酵素遺伝子多型と hypersensitivity syndrome. 炎症と免疫 10:153-6, 2002

伊崎誠一、薬疹 薬疹の統計 埼玉県における薬物副作用調査(1995・2002)の結果から分かること、日本臨床皮膚科医学会雑誌 73 : 185-90, 2002

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

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

— 薬物誘起性横紋筋融解症原因 SNP の探索と機能解析 —

主任研究者 千葉 寛

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、初年度は、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、Cytochrome P450 3A4 (*CYP 3A4*)、Multi drug resistance 1 (*MDR1*)、Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (*VLCAD*) および carnitine palmitoyltransferase II (*CPT II*) の 4 種の候補遺伝子の 1 塩基多型 (SNP, single nucleotide polymorphism) の検出法の確立を試み、*CYP3A4* においては 4 個、*MRP1* においては 3 個、*VLCAD* においては 33 個、*CPT II* に関しては 21 個の合計 61 個の SNPS の解析方法を確立する事が出来た。本年度は、SNPS として新たに *CYP3A4* に関して 18 個の SNP の解析方法を確立した他、トランスポーターとして multidrug resistance-associated protein 2 (*MRP2*) において 6 個、Organic anion transporting polypeptide-C (*OATP-C*) において 16 個 SNP の解析方法を確立した。また、エネルギー産生系の遺伝子として新たに Myophosphorylase (*PYGM*) において 42 個、Lactate dehydrogenase-A (*LDHA*) において 7 個の SNPS を解析方法を確立し、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 8 遺伝子合計 149 SNPS について解析を行った。さらに、SNPS の解析の結果、横紋筋融解症の発症した患者において *OATP-C* 遺伝子の変異の割合が高いことが明らかになったため、これらの変異を導入した哺乳動物培養細胞を作成し、トランスポーターの機能解析を行ったところ、T521C の変異を導入した *OATP-C* の薬物輸送活性は著しく低下していることが明らかとなった。さらに、この変異をホモおよびヘテロで持つ健康成人を対象にプラバスタチンの体内動態を野生型と比較したところ、ホモで持つ個体におけるプラバスタチンの非腎クリアランスはこの変異を持たない個体の約 1/6 に低下している事が明らかとなった。以上より、*OATP-C* 遺伝子における T521C 変異が HMG-CoA 還元酵素阻害剤による横紋筋融解症の原因の一つであることが強く示唆された。

研究協力者

千葉大学大学院薬学研究院薬物学 助教授 細川正清

ヒューマンサイエンス振興財団 研究支援者 清水敦子

鳥取大学医学部附属病院 助教授 家入一郎

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。一般的に横紋筋融解症には筋肉痛、筋力低下、ミオグロビン尿 (褐色尿) を認めるが、軽度の血中 CPK 上昇のみを認める無症候性のもことから急性腎不全を来す致死的な重症例まで様々なケースが存在する。原因としては外傷性 (過激な運動、圧迫、やけど、虚血) や非外傷性 (先天性、感染症、低カリウム血症、麻薬) があるが、近年、薬剤による横紋筋融解症 (薬剤性横紋筋融解症) が数多く報告されるようになった。

薬剤性横紋筋融解症の原因には、HMG-CoA 還元酵素阻害薬、フィブラート系薬剤、ニューキノロン系抗菌薬、塩酸リトドリン、バソプレシン、コルヒチン、シクロスポリンなど薬理作用の異なる多くの薬物が報告されているが、最も頻度が高いものは、HMG-CoA 還元酵素阻害薬である。HMG-CoA 還元酵素阻害薬を服用した患者のうち、横紋筋融解症の兆候症状であるミオパチーを発症する頻度は、単独投与で 0.1~0.5%、他剤との併用で 0.5~2.5%にのぼっている。HMG-CoA 還元酵素阻害薬が横紋筋融解症を引き起こす原因については、ユビキノン合成量の低下によるエネルギー産生量の減少、細胞内 Ca 濃度の上昇による細胞障害、タンパクのイソプレニル化の減少によるアポトーシスの誘導などが可能性と

して考えられているが、いずれも明確な機序の解明には至っていない。

HMG-CoA 還元酵素阻害薬による横紋筋融解症発症の報告には、薬物間相互作用によるものも数多く挙げられ、さらに HMG-CoA 還元酵素阻害薬の筋毒性は dose-dependent であるという報告もある。これらのことから、HMG-CoA 還元酵素阻害薬の血中濃度の上昇が横紋筋融解症の重要な要因の一つであると考えられる。このような薬物の血中濃度に影響を与える因子として薬物代謝酵素や薬物トランスポーターがあり、これらの遺伝子には薬物の体内動態に影響を与える変異の存在が認められている。

一方、先天性の横紋筋融解症については、エネルギー産生系酵素の遺伝子変異が原因のひとつと考えられている。これらの遺伝子に変異が存在すると、筋細胞内での ATP 合成量が低下し、筋細胞に障害を与えると推定されている。HMG-CoA 還元酵素阻害薬は生体内においてエネルギー産生量を低下させる可能性が示唆されており、エネルギー産生系酵素の遺伝子異常による筋障害と HMG-CoA 還元酵素阻害薬投与時の筋障害に何らかの因果関係がある可能性も考えられる。

以上、これまで報告されている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に、まず薬物代謝関連遺伝子とエネルギー産生系遺伝子をそれぞれ 4 種類ずつ、候補遺伝子とし 149 個の SNPS の解析法を確立した。つぎに、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 8 遺伝子合計 149 個の SNPS の解析を行った。さらに、解析の結果、横紋筋融解症の発症した患者に多くみられる変異については、人工的に変異を導入した哺乳動物発現系を作成し、機能解析を行うとともに、これらの変異遺伝子を持つ健康成人を対象にプラバスタチンの体内動態を変異を持たない個体と比較した。

B. 研究方法

日本人患者の末梢静脈血の採取は、研究内容について十分説明を行い、書面で同意を得て行った。末梢静脈血からのゲノム DNA の抽出は、エスアールエル（東京）に委託した。健康人由来のゲノム DNA は、健康日本人ボランティア（男性 7 名、女性 4 名、計 11 名）の末梢静脈血約 5mL より、GFX™ Genome Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) を用いて抽出することにより得た。

本研究は、千葉大学薬学研究院および医学研究院の倫理委員会で承認された。

今回の検討では、8 つの遺伝子 (*CPT II*、*VLCAD*、*PYGM*、*LDHA*、*MDR1*、*MRP2*、*OATP-C* および *CYP3A4*) について変異解析を行った。

変異解析は PCR-RFLP 法および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。シーケンスの解析は CEQ™ 2000 DNA Analysis System (BECKMAN, CA, USA) を用いて行った。

さらに、横紋筋融解症の患者で特徴的な変異に関しては、標的遺伝子の cDNA クローニングを行うとともに、PCR 法により変異を導入した哺乳動物発現用ベクターを作成し、ヒト由来細胞である HEK293 cell に発現させ、機能解析を行った。今回は、*OATP-C* を導入させた細胞を作成し、³H₃ でラベルした Estradiol 17β-glucuronide および Estron 3-Sulfate を基質としてトランスポーターの活性を測定した。

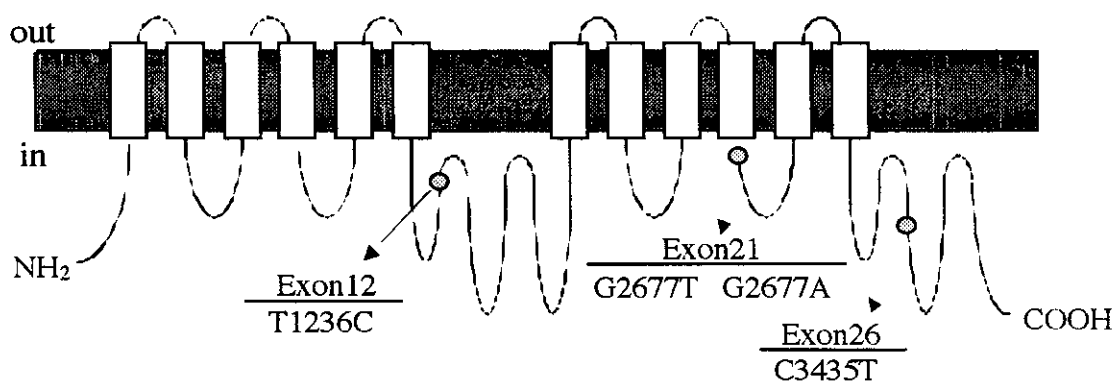


Fig. 1 Schematic drawing of MDR1 and its mutations

Table 1 Result of genotyping of three mutations within the *MDR1* gene and their frequencies.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Allelic Frequency Rhabdo. n=4	Allelic Frequency Control n=9	Allelic Frequency (Japanese, n=148) (Tanabe et al., 2001)
C1236T (silent)	C/C	C/T	C/T	C/T	37.5%	55.6%	65.2%
G2677T (A893S)	A/A	G/T	G/G	A/T	25.0%	22.2%	39.9%
G2677A (A893T)	A/A	G/T	G/G	A/T	37.5%	6.0%	19.2%
C3435T (silent)	C/C	C/T	C/C	C/C	12.5%	77.7%	46.1%

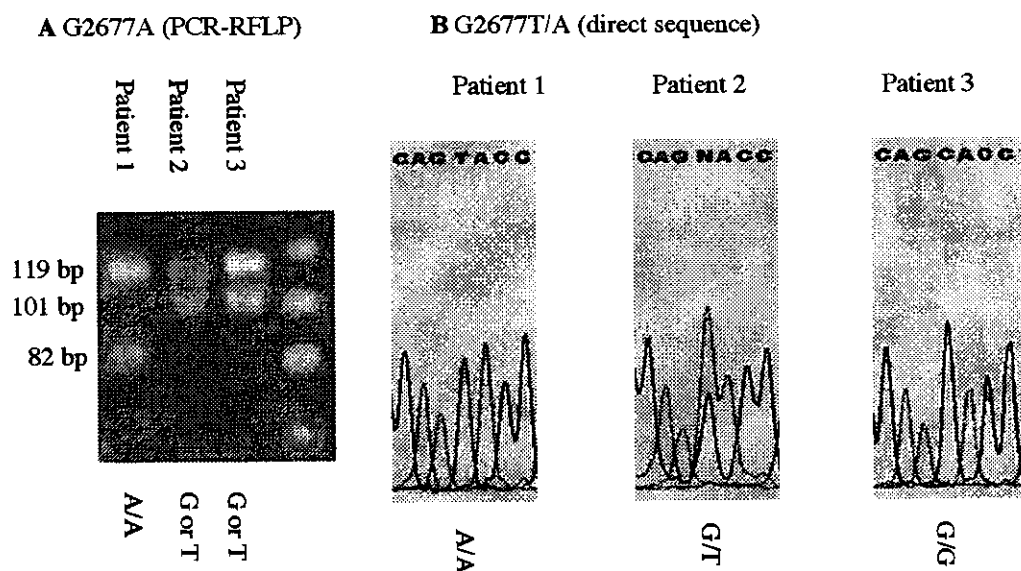


Fig. 2 PCR-RFLP analysis for the C1236T(A) and C3435T(B) mutations within the *MDR1* gene in three Japanese patients with drug induced rhabdomyolysis.

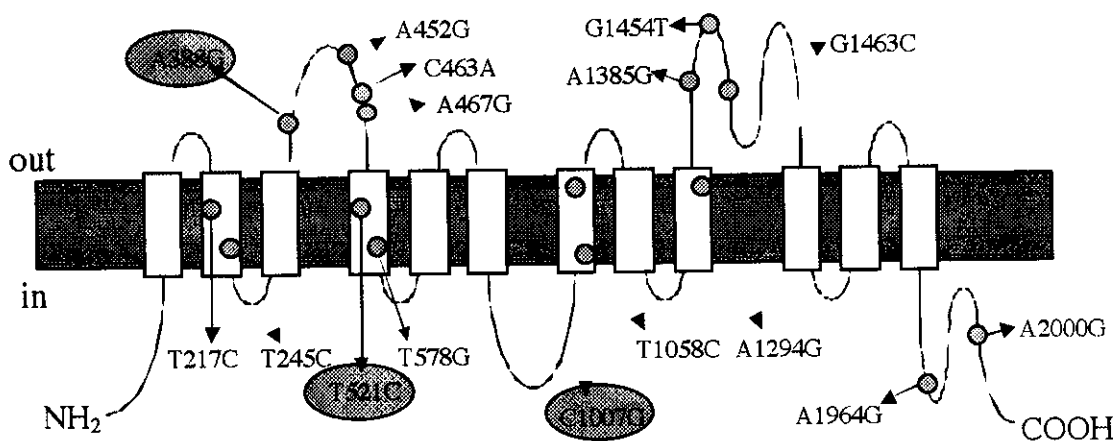


Fig. 3 Schematic drawing of OATP-C and its mutations

Table 2. Result of genotyping of three mutations within the *OATP-C* gene and their frequencies

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4 (PR,AT)	Allelic Frequency Rhapd. n=4	Allelic Frequency Control n=9	Allelic Frequency (Japanese, n=120) (冢入ら、2002)	*15
A388G (N130D)	G/G	G/G	G/G	G/G	100 %	66.7 %	62.9 %	
T521C (V174A)	T/C	T/C	C/C	T/C	62.5 %	5.5 %	15.8 %	
C1007G (P336R)	C/C	C/C	C/G	C/C	12.5 %	0 %	1.2 %	

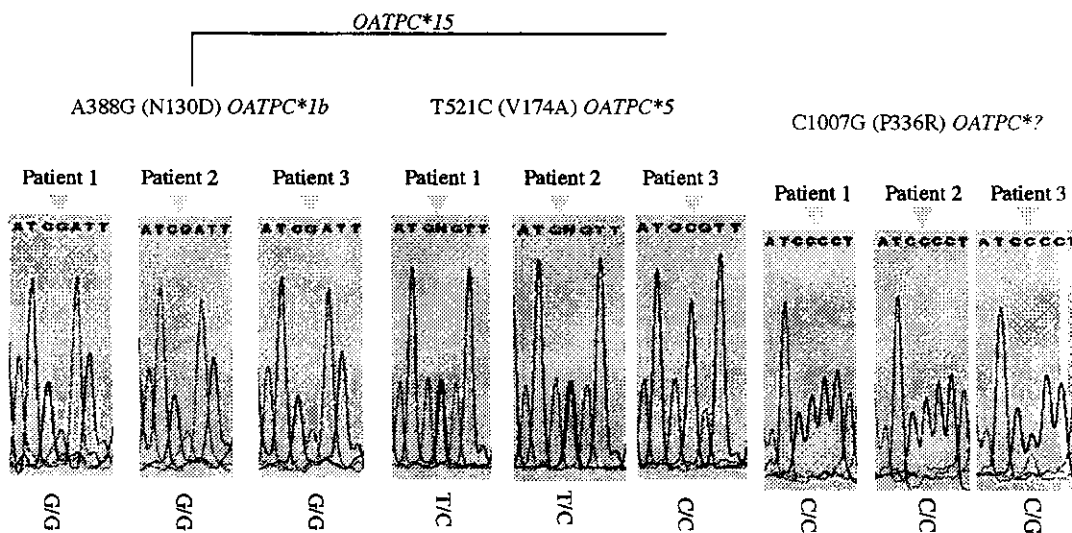


Fig. 4 Direct sequencing analysis for the A388G, T521C and C1007G mutations within the *OATP-C* gene in three patients with drug-induced rhabdomyolysis.

C. 研究結果および考察

本研究においては、HMG-CoA還元酵素阻害薬として、水溶性スタチンであるプラバスタチンおよびアトロバスタチン投与患者の中で、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8遺伝子合計149 SNPSについて解析を行った。

1. 横紋筋融解症の発症患者の臨床経過

1) 症例1

53歳日本人女性。高脂血症の治療のためプラバスタチンナトリウム 5mg/day が投与さ

れた。5日後、右上腕および背部に筋肉痛が出現したため、投与は中止された。CPK値に関しては不明である。また、筋肉痛の症状は投与中止後2日で消失した。このときの併用薬はプレドニゾン 10mg/dayであった。プラバスタチンナトリウムの中止後、高脂血症に対しプロブコール 500mg/day が処方された。プラバスタチンナトリウムを中止してから2年6ヶ月後、高脂血症に対しアトロバスタチン 5mg が投与された。その2~3時間後に背部の筋肉に激しい痛みが生じ、筋力低下も生じた。1回で投与は中止されたが、症状は終日続きその後回復した。CPK値に関しては不

明である。併用薬はプロブコール 500mg/day、プレドニゾロン 5mg/day、メトトレキサート 4mg/week であった。

2) 症例 2

64 歳日本人女性。高脂血症の治療のためプラバスタチンナトリウム 10mg/day が投与された。治療中に、運動後の筋肉痛が出現した。投与開始約 1 年半後、高脂血症に対しプラバスタチンナトリウム 20mg/day、プロブコール 1000mg/day へと処方変更された。このとき運動時の筋痙攣が認められたが、処方には続けられた。さらに約半年後、プラバスタチンナトリウムからアトルバスタチン 20mg/day へと処方の変更された。アトルバスタチン投与から 2 週間後、筋肉痛と褐色尿が出現した。投与 6 週間後、睡眠時に激しい筋肉痛と筋痙攣が出現した。投与 10 週間後、筋肉痛のため救急車で運ばれ緊急入院、薬剤の投与を中止した。CPK 値に関しては不明である。併用薬としてプロブコールと NSAIDs が投与されていた。しばらくは立ち上がることもできない状態が続いたが、投与中止 26 日後に立てるようになり、投与中止 8 ヶ月後に歩行可能となった。

3) 症例 3

61 歳日本人女性。高脂血症の治療のためプラバスタチンナトリウム 10mg/day が投与された。3 年 8 ヶ月後、CPK 値が 1274 U/L (正常値 : 50~210 U/L) であったためプラバスタチンナトリウムの投与を中止した。このとき筋肉痛や筋痙攣、褐色尿などは認められなかった。中止後 5 日で CPK 値が 209 U/L に低下。この患者には合併症あるいは発症時の併用薬はなかった。

4) 症例 4

63 歳日本人男性。高脂血症の治療のためプラバスタチンナトリウム 10mg/day が投与された。5 ヶ月後、CPK 値が 1863 U/L (正常値 : 50~210 U/L) であったためプラバスタチンナトリウムの投与を中止した。このとき筋肉痛や筋痙攣、褐色尿などは認められなかった。中止後 CPK 値が 663 U/L に低下。合併症は高血圧症、併用薬はファモチジン 20mgx2/day およびエナラプリル 2.5mg/day であった。

2. 遺伝子解析

1) 症例 1

今回検討を行ったエネルギー産生系遺伝子 (*CPT II*, *VLCAD*, *PYGM*, *LDHA*) については、全ての遺伝子で変異は見出されなかった。一方、薬物動態関連遺伝子に関しては、*MRP2* で変異は見つからなかったものの、*MDR1* に関して exon 21 の G2677T/A の A が homozygote として見出された (Table 1, Fig. 2)。さらに *OATP-C* については、A388G (N130D) が homozygote で、T521C (V174A) が heterozygote で存在することが明らかとなった (Table 2, Fig. 4)。

2) 症例 2

今回検討を行ったエネルギー産生系遺伝子 (*CPT II*, *VLCAD*, *PYGM*, *LDHA*) については、全ての遺伝子で変異は見つからなかった。一方、薬物動態関連遺伝子に関しては、*MRP2* で変異は見つからなかったものの、*MDR1* に関して exon 12 の C1236T と exon 26 の C3435T が heterozygote で、exon 21 の G2677T/A の T が heterozygote で見出された (Table 1, Fig. 2)。さらに *OATP-C* については、A388G (N130D) が homozygote で、T521C (V174A) が

heterozygote で存在することが明らかとなった (Table 2, Fig. 4)。

3) 症例 3

エネルギー産生系遺伝子では *VLCAD* の exon 2 の G128A が heterozygote で見出された。この SNP について健常日本人 11 検体で同様の解析を行ったところ、3 検体において heterozygote で検出された。その他のエネルギー産生系遺伝子 (*CPT II*、*PYGM*、*LDHA*) については変異は見つからなかった。一方、薬物動態関連遺伝子に関しては、*MRP2* で変異は見つからなかったものの、*MDR1* に関して exon 12 の C1236T が heterozygote で見つかった (Table 1, Fig. 2)。さらに *OATP-C* については、A388G (N130D) が homozygote で、T521C

(V174A) が homozygote で、C1007G (P336R) が heterozygote で見出された (Table 2, Fig. 4)。

4) 症例 4

今回検討を行ったエネルギー産生系遺伝子 (*CPT II*、*VLCAD*、*PYGM*、*LDHA*) については、全ての遺伝子で変異は見出されなかった。一方、薬物動態関連遺伝子に関しては、*MRP2* で変異は見つからなかったものの、*MDR1* に関して exon 21 の G2677T/A の A が heterozygote として見出された (Table 1, Fig. 2)。さらに *OATP-C* については、A388G (N130D) が homozygote で、T521C (V174A) が heterozygote で存在することが明らかとなった (Table 2, Fig. 4)。

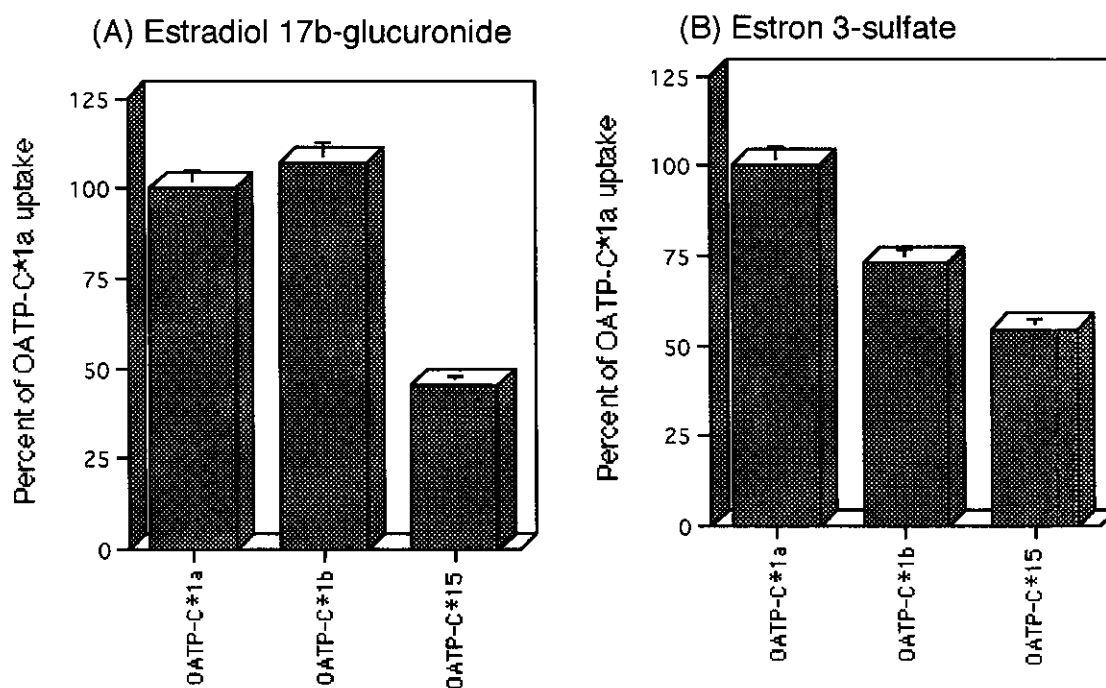


Fig. 5 The uptake of estradiol 17 β -glucuronide (A) and estrone 3-sulfate (B) by HEK293 cells transfected. Uptake of estradiol 17 β -glucuronide (50 nM) or estrone 3-sulfate (5 nM) were measured for 3 or 1 min and the results.

5) コントロール群との比較

上述した遺伝子について、HMG-CoA 還元酵素阻害剤を投与しても横紋筋融解症の発症しなかった患者の中で、特に水溶性スタチンであるプラバスタチン投与患者に限定して遺伝子解析を行ない、横紋筋融解症発症群と比較した。その結果、薬物動態関連遺伝子のなかで、*MDR1* に関して exon 21 の G2677T/A (A893T) に関しては、横紋筋融解症発症患者ではアレル頻度が 37.5%と高頻度であったが、発症しなかったコントロール群では、6.0%と両群間で大きな差が認められた (Table 1)。また、日本人にみられるアレル頻度と比較しても高いことが明らかとなった。一方、*OATP-C* の場合、A388G (N130D) の変異のアレル頻度が 100%と著しく高頻度なのに対し、コントロール群では 66.5%となっており、この変異に関しても両群間で差が見られた。また、T521C (V174A) についても横紋筋融解症発症患者では 62.5%に対しコントロール群では 5.5%と著しい差異が認められた。この A384G は *OATP-C*1b*、T521C は *OATP-C*5* と分類されており、これら両方の変異を持っている場合 *OATP-C*15* と分類されている。この *OATP-C*15* に関しては *in vivo* での機能低下が報告されていることから、今回横紋筋融解症発症患者で高頻度にみられた A384G および T521C が、横紋筋融解症の原因となる可能性が示唆された。また、今回症例 3 でみられた C1007G は、コントロール群では全く見られず、さらに家人らの調べた日本人 120 人におけるアレル頻度が 1.2%と極めて低いことから、この変異に関しても横紋筋融解症の原因となる可能性が考えられた。

3. *In vitro* 及び *in vivo* における *OATP-C* の機能解析

横紋筋融解症発症患者とコントロール群の遺伝子解析の結果、*OATP-C* 遺伝子の変異が横紋筋融解症の原因となる可能性が示唆されたので、次に人工的に変異を導入した *OATP-C* 遺伝子を発現させた HEK293 細胞を作成して機能解析を行った。その結果、Fig. 5 に示したように、estradiol 17 β -glucuronide を基質に用いた場合、*OATP-C*1a* の取り込み速度を 100%として、変異の影響を調べたところ、*OATP-C*1b* ではほとんど低下が見られなかったが、*1b と*5 の両方の変異を導入した場合、50%もの低下が認められた。また、estrone 3-sulfate を基質に用いた場合、*OATP-C*1b* で 25%、*1b と*5 の両方の変異を導入した場合、40%の低下が認められた。さらに、*OATP-C*1a* の取り込み活性についてプラバスタチンによる阻害を調べたところ、阻害が認められたことから、プラバスタチンは *OATP-C* の基質となり得ることが強く示唆され、*OATP-C* 遺伝子の変異がプラバスタチンによる横紋筋融解症の原因の一つであることが考えられた。さらに、T521C (V104A) の変異をホモで持つ個体 ($n = 1$) とヘテロで持つ個体 ($n = 9$) を対象にプラバスタチンを投与し、体内動態を T521C 変異を持たない個体 ($n = 4$) と比較したところ、ホモの個体ではプラバスタチンの非腎クリアランスがこの変異を持たない群と比較して約 1/6 に低下しており、ヘテロでは約 1/2 に低下している事が明らかとなった。以上より、*OATP-C* の変異、特に T521C はプラバスタチンをはじめとする水溶性スタチンによる横紋筋融解症の原因となる SNP の一つであることが強く

示唆された。

E. 結論

本研究において、HMG-CoA 還元酵素阻害剤による横紋筋融解症の発症の原因遺伝子をしらべたところ、*OATP-C* 遺伝子における変異が HMG-CoA 還元酵素阻害剤による横紋筋融解症の原因であることが強く示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shiraishi T, Hosokawa M, Kobayashi K, Tainaka H, Yamaura Y, Taguchi M, Chiba K. Effects of G169R and P34S substitutions produced by mutations of CYP2D6*14 on the functional properties of CYP2D6 expressed in V79 cells. *Drug Metab Dispos.* (2002) 30: 1201-5.

Mitsunaga Y, Kubota T, Ishiguro A, Yamada Y, Sasaki H, Chiba K, Iga T. Frequent occurrence of CYP2D6*10 duplication allele in a Japanese population. *Mutat Res.* (2002) 505: 83-5.

Kobayashi K, Urashima K, Shimada N, Chiba K. Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat. *Biochem Pharmacol.* (2002) 63: 889-96.

Iwahori, T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, Suzuki T. CYP3A4 inducible model for *in vitro* analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver *Hepatology*, (2003) 37, 665-673

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

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 の探索に関する研究

分担研究者 上田志朗 千葉大学大学院薬学研究院教授

研究要旨

本研究の目的は薬物有害反応の原因となる遺伝子と変異を同定することにより、有害反応の発現を未然に回避するための遺伝子診断法を確立することである。そのための具体的な目標として 薬剤誘起性横紋筋融解症を取り上げ、薬物有害反応原因遺伝子と SNP 探索を目標にした。我々は、本研究課題に関し、特に「DNA 試料収集の倫理面を含む方法論の確立と健常人及び薬剤誘起性横紋筋融解症患者検体の収集」に着手した。まず、千葉大学大学院医学および薬学研究院の生命倫理審査委員会に本研究計画を申請し、受理された。次に、対象患者の同定のために、本研究用の薬剤誘起性横紋筋融解症の診断基準（案）を作成した。また、千葉大学医学部附属病院の関連施設には、対象となる症例を認めた場合、本研究への協力をお願いしていただくよう協力を依頼するため「DNA 試料収集の倫理面を含む方法論の確立と健常人及び薬剤誘起性横紋筋融解症患者検体の収集に関する平成 14 年度第 1 回会議」を開催した。現在までに、薬物誘起性横紋筋融解症患者 8 例、対照者 22 例の症例を収集した。