

厚生労働科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究

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 | |
| 薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究 | ----- 2 |
| 千葉 寛 | |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. CYP2C9 の遺伝子多型と人種差 | ----- 9 |
| 越前宏俊 | |
| 2. トランスポーターの遺伝子多型と人種差 | ----- 11 |
| 家入一郎 | |
| 3. グルクロン酸転移酵素の遺伝子多型と人種差 | ----- 12 |
| 鹿庭なほ子 | |
| 4. CYP3A の遺伝子多型と人種差 | ----- 23 |
| 千葉 寛 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- 25 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- 27 |

I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

総括研究報告書

薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究

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、医薬品の体内動態を規定する主要な要因である薬物代謝酵素とトランスポーターに着目し、その変異遺伝子の発現頻度を日本人と他人種（白人種及び黒色人種）とで比較することによりその相違を明らかにし、医薬品の薬効と安全性に人種差が生じる原因の一端を明らかにする事である。本年度は、白人、黒人及び日本人各 150 人のゲノム DNA を用いて、薬物代謝酵素である CYP2C9、UGT、CYP3A4、薬物輸送担体である OATP-C 及び BCRP 遺伝子の解析を行った。その結果、OATP-C の遺伝子変異には明らかな人種差が見出された。特に日本人で頻度の高い *15 allele は輸送機能の低下を招くことから体内動態や効果についても人種差が予想された。一方、UGT1A1 遺伝子多型にも人種差が存在した。この人種差は、UGT1A1 の基質となる原薬及び活性代謝物の暴露の平均値及びばらつきの大きさの人種差の原因になり得ると考えられた。CYP3A4 については CYP3A4*1B に関する解析により、本研究で使用した白人種、黒人種、日本人のゲノムが、各人種の特徴を有する母集団であることが確認された。また、CYP2C9 については 3 人種に既知の多型検索が可能であることが確認された。本研究の遂行により薬効や安全性に生じる人種差の原因が推定され、国外から国内への臨床試験結果の外挿がより合理的に行えるようになる事が期待される。

分担研究者

越前宏俊

明治薬科大学教授

家入一郎

鳥取大学医学部付属病院薬剤部助教授

鹿庭なほ子

国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部室長

などの内的要因と医療環境などの外的要因に大別される。これらの要因の中で、遺伝要因は人種差の形成に最も重要な役割を果たしている。本研究の目的は医薬品の体内動態を規定する主要な要因である薬物代謝酵素とトランスポーターに着目し、その変異遺伝子の発現頻度を日本人と他人種（白人種及び黒色人種）とで比較することによりその相違を明らかにし、医薬品の薬効と安全性に人種差が生じる原因の一端を明らかにする事である。

B.研究方法

A. 研究目的

医薬品の効果や安全性には人種差が存在することがある。その原因は遺伝や生理的狀態

4 施設の共通の試料として、白人、黒人及び日本人各 150 人のゲノム DNA を用いて、薬物代謝酵素である CYP2C9（越前）、UGT

(鹿庭)、CYP3A4 (千葉)、薬物輸送担体である OATP-C (organic anion transporting polypeptide-C) BCRP (breast cancer resistance protein) (家入) の遺伝子に存在する SNPs の頻度解析を行った。

米国在住の白人種及び黒人種の末梢血は、テネシーブラッドサービスより購入した。日本人の血液 100 人分は、鳥取大学医学部附属病院から提供された (A 群等試料)。日本人の血液のうち 50 人分は、本研究のために新たに募集された志願者から提供を受けた。

DNA は定法に従い鳥取大学病院薬剤部で抽出した。

なお、本研究のために新たに募集された志願者から提供を受けた血液については、鳥取大学医学部附属病院から提供された血液とともに、連結不可能匿名化されたので、個人情報漏洩の危険性や人権に対する不利益の発生は排除されている。また、志願者を募ったそれぞれの施設において、適正な研究倫理審査が行われ、志願者には十分な説明を行った後に、インフォームドコンセントを取得した。また、鳥取大学医学部附属病院から提供された A 群等試料は、本研究において使用しても差し支えないことが同施設において承認された。市販の白人種、黒人種の血液については、研究目的に使用されることに同意して採血されたものであり、連結不可能匿名化されているため、倫理上の問題は発生しない試料である。

C. 研究結果

1) CYP2C9

CYP2C9*2 と*3 については、既に分担研究者が発現頻度の人種差の存在を報告している。今回は、新規の CYP2C9*4、*5、および*6 変異について、多数の検体を効率良く処理するための方法論を確立した。現在、この方法を用いて 450 検体の検討を進めており、

黒人特有の変異である CYP2C9*6 についてはほぼ 50%終了したが、現時点では黒人種を含むいずれの人種についてもこの変異は見出されていない。

2) OATP-C、BCRP

OATP-C: 基質薬物であるプラバスタチンの体内動態に関与することが報告されている N130D、V174A、2 種類の SNPs について、ハプロタイプも合わせ評価を加えた。日本人、白人、黒人における 130D 変異の頻度 (mean, 95%CI) はそれぞれ、(0.629, 0.568-0.690)、(0.457, 0.401-0.513)、(0.769, 0.712-0.826) であった。また、174A の頻度は (0.158, 0.112-0.204)、(0.120, 0.083-0.157)、(0.013, 0.0002-0.026) であった。ハプロタイプについては、*5 (130D 単独)、*15 (130D174A) について検討した結果、*5 allele の頻度はそれぞれ、0.000、0.015、0.000 であり、*15 allele では、0.150、0.056、0.014 であった。(2). BCRP: 日本人を対象とした遺伝子解析では、20 種類の SNPs が確認されており、そのうち、6 種類がアミノ酸置換あるいは stop codon への変化を伴う。現在までに V12M、Q126stop、Q141K について比較を行った。日本人、白人、黒人の変異頻度は、12M: (0.17, 0.12-0.22)、(0.04, 0.02-0.06)、(0.06, 0.03-0.09); 126stop: 0.01、0.00、0.00; 141K: (0.30, 0.24-0.36)、(0.11, 0.07-0.15)、(0.02) であった。

3) UGT

UDP グルクロノシル転移酵素の分子種のひとつである UGT1A1 をコードする遺伝子 UGT1A1 の 3 カ所の変異のアレル頻度をパイロシーケンス法で調べ、白人種、黒人種、日本人で比較した。UGT1A1 のプロモータ領域の (ta) の繰り返し数の違いから 4 つのタイプの遺伝子型が存在する *UGT1A1*28* に関しては、黒人種が最も多様性に富んでいた。白人種及び日本人では 2 つのタイプの遺伝子

型しか観測されなかったが、日本人の方が野性型の頻度は少し高かった。*UGT1A1*6* (G71R) においても変異型の発現頻度に著しい人種差が観測された。日本人においては変異型のアレル頻度は約 15%であったが、白人種及び黒人種では変異型は観測されなかった。*UGT1A1*27* (P229Q) においては、検討したサンプルの中では、3つの人種とも既知の変異型は観測されなかった。

*UGT1A1*27* のポジションでは、黒人種において報告されている変異とは異なる変異 (P229L) が新たに見出された。

4) CYP3A4

*CYP3A4*1B* に関しては、日本人 56 人すべてにおいて *CYP3A4*1B* は検出されなかった。一方、黒人種では、54 人中 28 人 (51.8%) が *CYP3A4*1B* のホモであり、21 人 (38.9%) がヘテロであった。*CYP3A4*1B* を保有しない黒人種はわずか 5 人 (9.3%) であった。白人種では、52 人中 4 人 (7.7%) が *CYP3A4*1B* のヘテロであり、48 人 (92.3%) では *CYP3A4*1B* は検出されなかった。これらの結果より、*CYP3A4*1B* の遺伝子頻度は、日本人が 0%、黒人種が 71.3%、白人種が 3.85%であることが示された。

*CYP3A4*4* および *CYP3A4*8* に関する denaturing HPLC 法による変異解析は、カラム温度を 57.5°C とすることにより解析可能な条件が得られた。

D. 考察

1) CYP2C9

CYP2C9 の遺伝子多型は、2002 年に cYP2C9*7 から*12 までの新規 6 変異が、命名委員会のホームページ上に主として Goldstein の研究室から登録されているが、詳細なゲノム情報と検出法については論文報告されていないため、未だ検出法を移植するに至っていない。次年度においては、初年度開始した CYP2C9*2、*3、*4、*5 および*6

の変異の解析を完了させる事と、上記のの新規変異への対応を検討する。

また、変異アレル種と頻度が明らかになった時点で、CYP2C9 遺伝子上の諸種変異アレルのハプロタイプ解析を施行することにより、ジェノタイプのみならずハプロタイプの面からも人種差を検討する可能性を模索する予定である。

2) OATP-C、BCRP

OATP-C 遺伝子に見る N130D 変異の頻度には明らかな人種差が認められ、黒人>>日本人>>白人であった。一方、174V では、黒人では殆ど見られないのに対し、日本人や白人では比較的高頻度に同程度見られることが明らかとなった。一方、ハプロタイプ解析の結果より *5 allele は白人特有の変異と言える。174A 変異を有する日本人の遺伝子型は *15 であり、殆どの場合、130D 変異も同時に有していることが明らかとなった。これらの結果から、以下の重要な点が指摘される。174V 変異の頻度は日本人、白人で同程度であるが、ハプロタイプで評価した場合、日本人ではすべてが *15 allele であるのに対し、白人では *5 と *15 が混在し、単に SNPs の頻度解析の正当性が疑問視される。*5 と *15 では薬物輸送能に差が見られることが *in vitro* 実験で指摘されており、体内動態や効果を評価する上で重要な留意点と言える。また、*15 allele を有する場合、プラバスタチン血中濃度の上昇が報告されており、輸送能の低下が原因と考えられることから、効果への影響も予想される。以上のことから、少なくともプラバスタチンの体内動態や効果には人種差の存在が示唆される。BCRP については、3種類の変異についてのみ評価を加えたが、OATP-C 同様に人種差が見られた。特に日本人での発現頻度が高いことから、機能への関与が今後の課題と言える。

3) UGT

今回の白人種及び黒人種の結果は、今までに報告されてきた野性型の発生頻度の範囲内と考えられ、今回用いたサンプルが、両人種のを代表していると考えて差し支えないと判断された。この結果は、また、SNP のタイピングの方法としては比較的新しいパイロシーケンス法が、信頼でき、有用な方法であることを示している。

UGT1A1 のプロモータ領域では (ta) の繰り返し数によって、(ta)₅、(ta)₆、(ta)₇、(ta)₈ の4つのタイプが報告されている。コントロール群に比し、高ビリルビン血症の患者では (ta)₇ の変異をヘテロ又はホモで有する患者が多いこと、SN-38 のグルクロン酸抱合能の平均値は、(ta)₇ 又は (ta)₈ を一つ以上有するヒトでは、これらを持たないヒトに比較して下がる⁴⁾ ことが報告されている。このことから、このポジションに関係した遺伝子多型は、医薬品のグルクロン酸抱合における平均値やばらつきの大きさの人種間差の原因になり得ると考えられる。このポジションの寄与に限ると、転写活性を促進する (ta)₆ を含む4つの遺伝子型の全てを有し、かつ転写活性が抑制される (ta)₇ の頻度が高い黒人種は、白人種や日本人よりも、グルクロン酸抱合のばらつきは大きいと考えられる。

今回、*UGT1A1*27* と同一のポジションで別のタイプの変異もあることが分かった。この変異の発現頻度は、現在までの検討では黒人種においてのみ 1% と低かった。しかし、これ以外の既知の *UGT1A1*27* に相当するアレルは、今回検討したサンプルの中には見つからず、野性型の頻度がどの人種においても 100% か又はそれに近かった。この変異は、今のところ日本人および台湾人以外での報告はない。また、約 100 人の細胞株の検討結果において見つけることができなかつたので、日本人における頻度も 1% よりも小さいもの

と推定している。また、この変異が、治療を要する Crigler-Najjar 症候群タイプ II と関連していることを考慮すると、健康人の試料にこの変異が含まれる確率が小さいことも予想される。*UGT1A1*27* は、*in vitro* での検討では SN-38 のグルクロン酸抱合能が非常に低下したので、この変異を有する患者では、グルクロン酸抱合活性が低下し、この酵素の基質となる医薬品の副作用発生の原因となる恐れは大いにある。しかし、クリアランスのばらつきの大きさや平均値の人種間差への寄与は小さいと考えられる。

*UGT1A1*6* の発生頻度については、日本人では有意に高いことが判明した。*In vitro* による組み換え実験では、*UGT1A1*6* の SN-38 のグルクロン酸抱合能は野性型のほぼ 50% であったが、イリノテカンを投与された患者においては、dose-limiting events を発生させる頻度は野性型と有意な差はなかったという報告がある。但し、基質による相違もあることから、このような大きな発現頻度の人種差は、医薬品によってはばらつきの大きさの原因となり得る。

本年度は、*UGT1A1* の3カ所の変異についてのみ検討したが、UGT1A の遺伝子の変異の幾つかは連鎖している可能性が示唆されているので、UGT1A のハプロタイプの人種差など、今後さらに検討が必要であろう。

4) CYP3A4

日本人、白人種、黒人種における *CYP3A4*1B* 遺伝子頻度は、それぞれ 0%、3.85%、71.3% であり、これまでに報告されている値とほぼ一致する結果であった。この事により、本研究で使用する白人種、黒人種、日本人のゲノムが、各人種の特徴を有する母集団であることが確認された。また、*CYP3A4*4* および *CYP3A4*8* に関しては、denaturing HPLC 法による迅速な変異解析が可能であることが示された。

E. 結論

1) CYP2C9

白人、黒人、アジア（日本）人の3人種における CYP2C9 遺伝子の既知の多型検索が可能であった。今後、新規報告の遺伝子多型アレル解析を経て、この CYP 分子種の遺伝多型の人種差が解明されるものと期待される。

2) OATP-C, BCRP

OATP-C 遺伝子変異には明らかな人種差が見られた。日本人で多い *15 allele は輸送機能の低下を招くことから体内動態や効果についても人種差が予想される。また、現在、遺伝子解析の主流である SNPs の頻度解析に加え、ハプロタイプ解析の重要性が指摘された。BCRP 遺伝子変異は日本人に頻度が高い傾向が見られ、変異の機能への影響についての検討が待たれる。

3) UGT

UGT1A1 の遺伝子多型には人種差が存在する。この人種差は、UGT1A1 の基質となる原薬及び活性代謝物の暴露の平均値及びばらつきの大さきの人種差の原因になり得る。今後、さらに、解析試料数を増やし、今回検討した部位での変異の発現頻度の人種差に関して最終的な結論を得る予定である。また、UGT1A の遺伝子の変異の幾つかは連鎖している可能性が示唆されているので、UGT1A のハプロタイプの人種差など、今後さらに検討が必要である。

4) CYP3A4

CYP3A4*1B に関する解析により、本研究で使用する白人種、黒人種、日本人のゲノムが、各人種の特徴を有する母集団であることが確認された。また、CYP3A4*4 と CYP3A4*8 に関しては、denaturing HPLC 法による迅速な変異解析が可能となったことから、本年度に作成した他の変異導入ベクターに関しても denaturing HPLC 法が変異解析に有用である

と考えられた。

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

Takahashi H, Wilkinson GR, Caraco Y, Muszkat M, Kim RB, Kashima T, Kimura S, Echizen H: Population differences in (S)-warfarin metabolism between CYP2C9 genotype-matched Caucasians and Japanese. *Clin Pharmacol Ther*, 73:253-63, 2003.

Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H et al., Polymorphism of OATP-C(SLC21A6) and OAT3(SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin*

Pharmacol Ther in press

3. その他 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

H. 健康危険情報

1. 特許取得 なし

なし

2. 実用新案登録 なし

II 分担研究報告

薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究 (14130301)

分担研究者 越前 宏俊 明治薬科大学 教授

研究要旨 諸外国における研究で得られた新規医薬品に関わる薬物動態および感受性のデータを我が国での臨床試験にブリッジするためには、薬物動態に関連する機能分子である薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子多型情報が重要である。なかでもチトクローム P450(CYP)は多くの薬物の体内動態の個人差に関連するため、酵素の活性を左右する遺伝子多型の情報が有益となる。本研究では、我々は肝薬物代謝酵素である CYP 分子種中でも CYP3A に次いで発現量の多い CYP2C ファミリーの遺伝子多型について検討を行うこととした。白人と黒人サンプルに関しては、共同入手した DNA 試料を用いて検討を開始した。日本人サンプルについては、施設内倫理委員会の了承の下に分担分 20 サンプルを採取し抽出を依頼した。現時点では、CYP2C9*2 および*3 に加えて、黒人サンプルで 3%前後の頻度が期待される CYP2C9*6 の多型検索から検討を開始しているが黒人サンプル約 50%終了時点で、CYP2C9*6 変異は未だ検出に至っていない。

A.研究目的

諸外国における研究で得られた新規医薬品に関わる薬物動態および感受性のデータを我が国での臨床試験にブリッジするためには、薬物動態に関連する機能分子である薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子多型情報が重要である。なかでもチトクローム P450(CYP)は多くの薬物の体内動態の個人差に関連するため、酵素の活性を左右する遺伝子多型の情報が有益となる。本研究では、我々は肝薬物代謝酵素である CYP 分子種中でも CYP3A に次いで発現量の多い CYP2C ファミリーの遺伝子多型を受け持ち、白人、黒人、アジア（日本）人、各 150 検体について検討を行うこととした。

B. 研究方法

白人と黒人サンプルに関しては、協同入手した物を入手した。日本人サンプルについては、施設内倫理委員会の了承を受けた上で、分担研究者の担当分 20 サンプルを採血し抽出を他の分担研究者（鳥取大学、家入氏）に依

頼した。

今年度は、人種間で遺伝子多型の種類と出現頻度に大きな差異があり、かつ既知の遺伝子多型が CYP 分子種の活性に大きな影響の

ある CYP2C9*2、*3、*4 および*5 について検討を開始した。具体的には、CYP2C9*2 については、我々が従来から用いている PCR-制限酵素断片長多型(RFLP)法により判定し、CYP2C9*3、*4 と*5 は、変異部位が同一のエクソン 7 に存在するため、このエクソンのほぼ全長を PCR 法で増幅し、シークエンスにより同時解析をおこなった。更に、近年黒人が報告のあった、CYP2C9*6 変異については、Kidds らの PCR-RFLP 法により解析した。

C. 研究結果

本年度は、研究実施に至る準備段階が必要であったため、遺伝子解析を開始した時期が遅く、予備的データを報告するのみにとどまった。CYP2C9*2 と*3 については、従来から分担研究者および他の研究者が報告して頻度の変異が検出されている。また、新規の

CYP2C9*4、*5、および*6 変異については、多数の検体を効率良く処理するための方法論の確立の後、現在検討を進めている。CYP2C9*6 においては、黒人特有の変異であり3%前後のアレル頻度が期待されるため、黒人サンプルから検索を開始しているが、ほぼ50%終了時点で未だ陽性結果を検出するに至っていない。

D. 考察

CYP2C9 の遺伝子多型は、2002 年に cYP2C9*7 から*12 までの新規 6 変異が、命名委員会のホームページ上に主として Goldstein の研究室から登録されているが、詳細なゲノム情報と検出法については論文報告されていないため、未だ検出法を移植するに至っていない。次年度においては、初年度開始した CYP2C9*2、*3、*4、*5 および*6 の変異の解析を完了させる事と、上記のの新規変異への対応を検討する。

また、変異アレル種と頻度が明らかになった時点で、CYP2C9 遺伝子上の諸種変異アレルのハプロタイプ解析を施行することにより、ジェノタイプのみならずハプロタイプの面からも人種差を検討する可能性を模索する予定である。

E. 結論

白人、黒人、アジア（日本）人の 3 人種における CYP2C9 遺伝子の既知の多型検索が可能であった。今後、新規報告の遺伝子多型アレル解析を経て、この CYP 分子種の遺伝多型の人種差が解明されるものと期待される。

F. 健康被害状況

初年度における健康人日本人血液サンプルの採取に関して、倫理上および健康上の被害はありませんでした。

G. 研究発表

1.論文発表

Takahashi H, Wilkinson GR, Caraco Y, Muszkat M, Kim RB, Kashima T, Kimura S, Echizen H: Population differences in (S)-warfarin metabolism

between CYP2C9 genotype-matched Caucasians and Japanese. Clin Pharmacol Ther, 73:253-63, 2003.

2.学会発表

Echizen H. Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. 14th International Symposium on Microsomal Drug Oxidation. 2002年7月22-26日、札幌

四方絵理子、家入一郎、井上和子、小出智子、高根浩、大坪健司、石黒眞吾、應儀成二、高橋晴美、越前宏俊、患者遺伝情報を考慮したワルファリン適正使用への試み、平成15年3月29日、長崎

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度の成果についてはありません。

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究

分担研究者 家入 一郎 鳥取大学医学部付属病院薬剤部助教・副薬剤部長

研究要旨：日本人、白人、黒人より採取したDNA(N = 100~150)を用い、OATP-C、BCRP、2種類の薬物輸送タンパク遺伝子に見られる変異の頻度を比較検討した。OATP-Cについては、基質薬物の体内動態に影響する130位(Asn130Asp)、174位(Val174Ala)の変異に注目した。Asn130Asp変異の頻度は、日本人、白人、黒人間で有意な頻度差を認めた。一方、Val174Alaは黒人では殆ど認められないのに対し、日本人や白人では同程度の頻度(0.12~0.16)であった。しかし、両変異のハプロタイプ解析では、Val174Alaを有する日本人の殆どはAsn130Asp変異を同時に有するのに対し、白人ではVal174Alaのみの変異を有する被検者が全体の2割に見られた。両変異が同時に生じることで輸送機能がより顕著に低下することが報告されており、単にSNPsの頻度の比較が適当でない留意点が指摘される。BCRPについては、3箇所の変異頻度の比較を行った。その結果もいずれの変異も日本人で頻度が高い傾向が認められた。

A. 研究目的

医薬品の効果や体内動態には人種差が存在することが知られているが、その原因の1つに関連タンパクをコードする遺伝子上に存在する変異(SNPs)の人種間における頻度の差が挙げられる。本研究では、医薬品の体内動態や効果を規定する薬物輸送タンパク(トランスポーター)に注目し、SNPsやハプロタイプの頻度を日本人と他人種と比較することで、効果や体内動態の人種差の原因を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

健康な日本人、白人、黒人より得たゲノムDNA、各150検体を試料とした。変異部位等の情報が不十分な遺伝子については、変異を同定した。Cording regionsを中心にPCRを行い、SSCPでスクリーニングの後、direct sequenceあるいはcloningにより、変異を同定した。遺伝子診断は、変異を特異的に検出するprobe (TaqMan probe)を作成の後、sequence detection systemにより行った。(倫理面への配慮)白人、黒人の血液は、研究用に採血されたもので、米国血液供給会社より購入した。日本人検体については、健康成人ボランティアから得た。本研究の目的等、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に準拠した説明を行い、各自より書面による承諾を得た後に試料とした。本研究は、鳥取大学医学部倫理審査委員会により審査・承認を得た後に実施した。すべての日本人検体は鳥取大学医学部付属病院において連結不可能匿名化を行い、血液からDNAを抽出後、共通の番号を付け各共同研究施設に送付した。

C. 研究結果

OATP-C (organic anion transporting polypeptide-C)およびBCRP (breast cancer resistance protein)について検討を加えた。(1) OATP-C: 基質薬物であるプラバスタチンの体内動態に関与することが報告されているN130D、V174A、2種類のSNPsについて、ハプロタイプも合わせ評価を加えた。日本人、白人、黒人における130D変異の頻度(mean, 95%CI)はそれぞれ、(0.629, 0.568-0.690)、(0.457, 0.401-0.513)、(0.769, 0.712-0.826)であった。また、174Aの頻度は(0.158, 0.112-0.204)、(0.120, 0.083-0.157)、(0.013, 0.0002-0.026)であった。ハプロタイプについては、*5 (130D単独)、*15(130D174A)について検討した結果、*5 alleleの頻度はそれぞれ、0.000、0.015、0.000であり、*15 alleleでは、0.150、0.056、0.014であった。(2) BCRP: 日本人を対象とした遺伝子解析では、20種類のSNPsが確認されており、そのうち、6種類がアミノ酸置換あるいはstop codonへの変化を伴う。現在までにV12M、Q126stop、Q141Kについて比較を行った。日本人、白人、黒人の変異頻度は、12M: (0.17, 0.12-0.22)、(0.04, 0.02-0.06)、(0.06, 0.03-0.09); 126stop: 0.01、0.00、0.00; 141K: (0.30, 0.24-0.36)、(0.11, 0.07-0.15)、(0.02)であった。

D. 考察

OATP-C遺伝子に見るN130D変異の頻度には明らかな人種差が認められ、黒人>>日本人>>白人であった。一方、174Vでは、黒人では殆ど見られないのに対し、日本人や白人では比較的高頻度に同程度見られることが明らかとなった。一方、ハプロタイプ解析の結果より*5 alleleは白人特有の変異と言える。174A変異を有する日本人の遺伝子型は*15であり、殆どの場合、130D変異も同時に有していることが明らかとなった。これらの結果から、以下の重要な点が指摘される。174V変異の頻度は日本人、白人で同程度であるが、ハプロタイプで評価した場合、日本人ではすべてが*15 alleleであるのに対し、白人では*5と*15が混在し、単にSNPsの頻度解析の正当性が疑問視される。*5と*15では薬物輸送能に差が見られることがin vitro実験で指摘されており、体内動態や効果を評価する上で重要な留意点と言える。また、*15 alleleを有する場合、プラバスタチン血中濃度の上昇が報告されており、輸送能の低下が原因と考えられることから、効果への影響も予想される。以上のことから、少なくともプラバスタチンの体内動態や効果には人種差の存在が示唆される。BCRPについては、3種類のSNPsについてのみ評価を加えたが、OATP-C同様に人種差が見られた。特に日本人での発現頻度が高いことから、機能への関与が今後の課題と言える。

E. 結論

OATP-C遺伝子変異には明らかな人種差が見られた。日本人で多い*15 alleleは輸送機能の低下を招くことから体内動態や効果についても人種差が予想される。また、現在、遺伝子解析の主流であるSNPsの頻度解析に加え、ハプロタイプ解析の重要性が指摘された。BCRP遺伝子変異は日本人に頻度が高い傾向が見られ、変異の機能への影響についての検討が待たれる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

プラバスタチン体内動態に寄与するアニオン輸送タンパク遺伝子多型、日本薬学会、第123年会、長崎、要旨集-4, p170, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在までに特許出願、登録はない。

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

（分担）研究報告書

薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究

分担研究者 鹿庭 なほ子 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部室長

研究要旨 UDP グルクロノシル転移酵素の分子種のひとつである UGT1A1 をコードする遺伝子 UGT1A1 の3カ所の変異のアレル頻度をパイロシーケンス法で調べ、白人種、黒人種、日本人で比較した。UGT1A1 のプロモータ領域の(ta)の繰り返し数の違いから4つのタイプの遺伝子型が存在する UGT1A1*28 に関しては、黒人種が最も多様性に富んでいた。白人種及び日本人では2つのタイプの遺伝子型しか観測されなかったが、日本人の方が野性型の頻度は少し高かった。UGT1A1*6 (G71R) においても変異型の発現頻度に著しい人種差が観測された。日本人においては変異型のアレル頻度は約 15%であったが、白人種及び黒人種では変異型は観測されなかった。UGT1A1*27 (P229Q) においては、検討したサンプルの中では、3つの人種とも既知の変異型は観測されなかった。UGT1A1*27 のポジションでは、黒人種において報告されている変異とは異なる変異 (P229L) が新たに見つかった。

観測された UGT1A1 の遺伝子型の発現頻度の人種差は、UGT1A1 の基質となる原薬及び活性代謝物の暴露の平均値及びばらつきの大きさの人種差の原因になり得る。

A. 研究目的

現在、医薬品開発のグローバル化が急速に進みつつある。しかし、新医薬品の承認申請に当たり、国外で得られた臨床試験の結果を日本人に外挿するためには、医薬品の効果と安全性について人種による差異を考慮しなければならない。そのため、ICH（新医薬品承認申請に関わる日欧米3極間における国際会議）では、ある人種で得られた結果を他の人種に外挿するためのブリッジングスタディを義務づけているが、その過程を通して多くの医薬品の体内動態に

人種差が存在することが明らかにされてきた。しかし、その差異を説明するための基本的な情報は CYP2D6 や CYP2C19 など一部の薬物代謝酵素に限られており、その他の薬物代謝酵素やトランスポーターについては信頼できる基本情報が得られていない。本研究は医薬品の体内動態を規定する主要な要因である薬物代謝酵素とトランスポーターに着目し、その変異型遺伝子の発現頻度を日本人と他人種(白人種及び黒人種)とで比較することによりその差を明らかにし、医薬品の薬効と安全性に人種差が

生じる原因の一端を究明する事を目的としている。薬効発現の人種差に関わる情報基盤を形成することは厚生労働行政上の重要な課題と考えられる。

UDP グルクロノシル転移酵素 (UGT) は、投与された薬物および代謝物を、水溶性の高いグルクロン酸抱合体に変換させることにより薬物の解毒化を担う酵素である。グルクロンサン抱合は、第 II 相の代謝の約 40% を占める。¹⁾ ヒトの UGT は、構成するアミノ酸配列の一次構造の類似性から、UGT1A、UGT2A 及び UGT2B に分けることができ、UGT1A 及び UGT2B ではそれぞれ幾つかの分子種がクローン化されている。UGT1A 遺伝子には、UGT1A1、UGT1A3、UGT1A4、UGT1A5、UGT1A6、UGT1A7、UGT1A8、UGT1A9、UGT1A10 の分子種が確認されており、この他に、蛋白が確認されていない UGT1A2、UGT1A11、UGT1A12、UGT1A13 の pseudo gene が存在する。各 UGT1A 分子種の mRNA の大きさは約 1.6 kb であり、蛋白質は約 50 kDa、530 前後のアミノ酸からなる。UGT1A のエクソン 2~5 は各分子種に共通であり、基質結合部位と考えられるエクソン 1 だけが、互いに異なる。

UGT1A1 は、フェノール類、アントラキノン・フラボン類、クマリン類など、幅広い化合物を基質としてグルクロン酸抱合を行う。生体成分の基質としては、アンドロジェン型ステロイドの代謝を担い、また、ビリルビンのグルクロン酸抱合を行う唯一の酵素である。さらに、UGT1A1 は抗癌剤イリノテカンの活性代謝物である SN-38 をグルクロン酸抱合することで知られており、UGT1A1 の変異と、イリノテカン投与

によって生じる重篤な下痢及び骨髄抑制との関連が疑われている。²⁻⁴⁾

UGT1A1 には、現在までに 35 の多型が報告されており、これらの多くは高ビリルビン血症を主症状とする Crigler-Najjar (CN) 症候群タイプ I、タイプ II または Gilbert 症候群と関係している。⁵⁾ UGT1A1*28、⁶⁾ GT1A1*6、⁷⁾ 及び、UGT1A1*27⁷⁾ は *in vitro* 代謝実験において、SN-38 の代謝活性が低下することが確認されているので、本年度は、これらの遺伝子多型の人種差を検討することとした。

B. 研究方法

試料：DNA は末梢血より採取した。白人種及び黒人種の末梢血は、テネシーブラッドサービスより購入した。日本人の血液 100 人分は、鳥取大学医学部附属病院から提供された (A 群等試料)。日本人の血液のうち 50 人分は、本研究のために新たに募集された志願者から提供を受けた。PCR 用及びシーケンス用プライマーはプロリゴ社製を、DNA ポリメラーゼはタカラ社製の Taq ポリメラーゼを、また、SNP リージェントキットはバイオット社製を用いた。その他の試薬は、特級を用いた。PCR は GeneAmp, PCR System 9700 (Applied Biosystems 社製) を用いた。パイロシーケンスは、PSQ 96MA System (バイオット社製) を用いて行った。

DNA 抽出：定法に従い DNA を抽出した。
遺伝子多型のタイピング：遺伝子のタイピングはパイロシーケンス法⁸⁾ により行った。UGT1A1 のプロモータ領域、翻訳開始点より 211 番目の塩基、翻訳開始点より 686 番目の塩基の 3 カ所の周辺部分の DNA を、

forward 又は reverse 側のどちらか一方をビオチンでラベルしたプライマーを用いて、PCR で増幅させた。ビオチンラベルされた PCR 産物を streptavidin をコートしたセファロースビーズに吸着させ、アルカリ変性によって1本鎖とし洗浄した後に、シーケンス用プライマーを添加して、タイピングを行った。

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針との関係：本研究のために新たに募集された志願者から提供を受けた血液については、鳥取大学医学部附属病院から提供された血液とともに、連結不可能匿名化されたので、個人情報の漏洩の危険性や人権に対する不利益の発生は排除されている。また、志願者を募ったそれぞれの施設において、適正な研究倫理審査が行われ、志願者には十分な説明を行った後に、インフォームドコンセントを取得した。また、鳥取大学医学部附属病院から提供された A 群等試料は、本研究において使用しても差し支えないことが同施設において承認された。市販の白人種、黒人種の血液については、研究目的に使用されることに同意して採血されたものであり、連結不可能匿名化されているため、倫理上の問題は発生しない試料である。

C. 研究結果

(1) サンプルサイズに関する検討

本研究では、試料の集め易さと 1%の頻度で発生する SNP を見逃さないことを考慮して、各人種 150 人ずつの試料を対象としてタイピングを行うこととした。これは、アレル数 300 のサンプル（標本）に相当する。このサンプルサイズについて、変異遺

伝子の発現頻度の推定値の精度、及び、変異遺伝子の発現頻度の人種差の検出力を検討した。

母集団においてある性質、例えば野性型遺伝子、を持っているものの割合を p で表すと、母集団から n 個の標本を抜き取って比率を調べるとき、比率の標準誤差 σ_p は

$$\sigma_p = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

で表される。 n 個の試料からなる標本を調べて、母集団においてある性質を持つものの割合が \bar{p} と推定されたとき、真の比率 p の 95%信頼区間は、次式で表される。

$$\bar{p} - 1.96\sigma_p \leq p \leq \bar{p} + 1.96\sigma_p$$

この式を用いて、 \bar{p} が 0.05、0.1 及び 0.2 のときの母集団の真の比率の 95%信頼区間を計算した結果を Fig. 1 に示した。サンプルサイズ（アレル数）が 300 のときには、 \bar{p} が 0.05 では、信頼区間は ± 0.025 であり、一方、 \bar{p} が 0.2 では、信頼区間は ± 0.04 程度であった。図には示さなかったが、信頼区間は \bar{p} の値が 0.5 に近いほど広がる傾向にあり、 $\bar{p}=0.4$ においてはその信頼区間の中は ± 0.048 であった。

一方、Table 1 には、ある性質を持つものの比率の集団間の差を検討するとき、特定の大きさの差を検出するために必要なサンプルサイズを示した。ここでは、2つの集団間で比率に差がないときに誤って有意差があると判定する過誤を 0.05、2つの集団間で比率に差があるときに誤って差がな

いと判定する過誤を 0.1 にして計算を行った。すなわち、この計算では、検出力は 0.9 ということになる。比率が小さい方の集団における p が 0.2 より小さいときには、本研究で採用したサンプルサイズでは、ほぼ 0.9 の検出力で集団間の比率の差 0.1 を検出できることを、Table 1 は示している。それよりも p が大きくなると、本研究で用いるサンプルサイズでは、検出力を 0.9 に保つと、検出できる比率の差は 0.1 よりもやや大きくなる。

(2) 遺伝子多型のタイピング

今回検討した UGT1A1 の 3 つの遺伝子多型に関連した位置の塩基配列を Fig. 2 に示した。これらの変異について、本年度は、パイロシーケンス法でタイピングを行った。始めに、試験に用いる DNA 溶液の量を、5 人分の試料で検討した。全ての試料で、0.5 μ L を用いることにより、パイロシーケンス法で DNA を検出できた。また、Fig. 3 に示すごとく、DNA の量を 0.5 μ L から 5 μ L に変化させても、検出される光量に変化が見られなかった。これらの結果から、0.5 μ L で既に PCR で増幅される DNA 量は飽和に達することが判明したので、本研究では、DNA 溶液は 0.5 μ L を使用することとした。

なお、本研究の倫理審査の最終承認が得られたのが 2 月半ばであったために、日本人の志願者から得られる予定の DNA は入手できなかったため、日本人試料の遺伝子解析は行えなかった。そのため、今年度の、各部位における変異の日本人の発現頻度に関しては、日本人より得た細胞株を用いてダイレクトシーケンス法で解析された結

果を参考値として示すことにする。また、白人種及び黒人種についても、血液の入荷時期が遅かったために、全試料を解析することはできなかったため、途中経過を報告する。

a) UGT1A1*28

UGT1A1*28 は UGT1A1 のプロモータ遺伝子に生じる変異である。野性型では、この領域における(TA)の繰り返し数は 6 であるが、変異型として繰り返し数が 5、7 及び 8 が報告されている (Fig. 2)。*In vitro* のリポーターアッセイでは、繰り返し数 5 の変異では転写活性が野性型よりも高くなるが、繰り返し数 7 又は 8 の変異では転写活性が約半分程度に落ちると報告されている。⁴⁾ また、繰り返し数 7 又は 8 の変異は、軽度の高ビリルビン血症を伴う Gilbert 症候群と関連づけられている。⁵⁾ Gilbert 症候群は、通常は治療の必要性はないとされるが、新生児黄疸の原因のひとつと言われており、また、イリノテカン投与における重篤な副作用との関連も指摘されている。

UGT1A1 のプロモータ領域における遺伝子多型のアレル頻度を Table 2 に示した。白人種及び黒人種の各遺伝子多型の頻度は、報告されている範囲^{10, 11)}であった。

b) UGT1A1*6

UGT1A1*6 は、日本人の Gilbert 症候群の患者に多いとされる変異で、転写開始点より 211 番目の塩基が G より A に変わるもので、グリシンからアルギニンへのアミノ酸変異を伴う (Fig. 2)。変異型をホモ又はヘテロで有するヒトの血漿中ビリルビンの濃度は、野性型をホモに有するヒトに比

較して約 1.5 倍ほど高いと言われている。⁹⁾ また、*in vitro* 発現実験によれば、UGT1A1*6 の SN-38 に対するグルクロン酸抱合活性は野性型の約 50%であった。⁷⁾

この位置に関して、白人種 35 人分、黒人種 40 人分の DNA を測定した。Table 3 に、野性型と変異型のアレル頻度を示した。日本人の細胞株では、野性型のアレル頻度は約 16%であった。一方、白人種及び黒人種からはこの部位の変異は検出されず、日本人とその他の人種との間の UGT1A1*6 の発現頻度の差は有意であった。日本人では野性型をヘテロ及びホモで持つヒトの比率は、それぞれ、25%前後及び 2, 3%と推定できる。

c) UGT1A1*27

UGT1A1*27 は、翻訳開始点より 686 番目の塩基が C から A に変わるもので、プロリンからグルタミンへのアミノ酸変異を伴う (Fig. 2)。この変異は、Gilbert 症候群及び治療を要する中程度の高ビリルビン血症を引き起こす Crigler-Najjar 症候群タイプ II の日本人患者から見つかっている。^{12, 13)} *in vitro* 発現実験によれば、UGT1A1*27 の SN-38 に対するグルクロン酸抱合活性は野性型の約 11%であった。⁷⁾

この位置に関して、白人種 48 人分、黒人種 48 人分の DNA を測定し、Table 4 にその結果を示した。今回、黒人種の一人から、UGT1A1*27 と同じ位置で、既知の塩基変換 C→A とは別の塩基変換 C→T が見つかった。この塩基変換は、プロリンからロイシンへのアミノ酸置換 (Pro229Leu) をもたらす。それ以外では、白人種、黒人種、日本人の細胞株からは、UGT1A1*27

の変異は見つからなかった。

D. 考察

サンプルサイズの検討では、変異の発現頻度の推定の精度は±5%を保持でき、推定精度としては十分と考えられた。また、本研究で用いているアレル数 300 というサンプルサイズでは、2つの集団間の変異の発現頻度の差 10%を、検出力 90%近くで検出できることが判明した。この検出力は、代謝酵素の民族間差を論じる目的には、十分と考えられる。

UGT1A1*28 の発生頻度の人種差については既に幾つかの報告がある。^{10, 11)} 今回の白人種及び黒人種の結果は、今までに報告されてきた野性型の発生頻度の範囲内と考えられ、今回用いたサンプルが、両人種のを代表していると考えて差し支えないと判断された。この結果は、また、SNP のタイピングの方法としては比較的新しいパイロシーケンス法が、信頼でき、有用な方法であることを示している。

UGT1A1 のプロモータ領域では(ta)の繰り返し数によって、(ta)₅、(ta)₆、(ta)₇、(ta)₈ の4つのタイプが報告されている。コントロール群に比し、高ビリルビン血症の患者では(ta)₇ の変異をヘテロ又はホモで有する患者が多いこと、⁹⁾ SN-38 のグルクロン酸抱合能の平均値は、(ta)₇ 又は(ta)₈ を一つ以上有するヒトでは、これらを持たないヒトに比較して下がる⁴⁾ ことが報告されている。このことから、このポジションに関係した遺伝子多型は、医薬品のグルクロン酸抱合における平均値やばらつきの大きさの人種間差の原因になり得ると考えられる。このポジションの寄与に限ると、転写活性

を促進する (ta)₅ を含む 4 つの遺伝子型の全てを有し、かつ転写活性が抑制される (ta)₇ の頻度が高い黒人種は、白人種や日本人よりも、グルクロン酸抱合のばらつきは大きいと考えられる。

今回、UGT1A1*27 と同一のポジションで別のタイプの変異もあることが分かった。この変異の発現頻度は、現在までの検討では黒人種においてのみ 1%と低かった。しかし、これ以外の既知の UGT1A1*27 に相当するアレルは、今回検討したサンプルの中には見つからず、野性型の頻度がどの人種においても 100%か又はそれに近かった。この変異は、今のところ日本人および台湾人以外での報告はない。また、約 100 人の細胞株の検討結果において見つけることができなかつたので、日本人における頻度も 1%よりも小さいものと推定している。また、この変異が、治療を要する Crigler-Najjar 症候群タイプ II と関連していることを考慮すると、健康人の試料にこの変異が含まれる確率が小さいことも予想される。UGT1A1*27 は、*in vitro* での検討では SN-38 のグルクロン酸抱合能が非常に低下したので、この変異を有する患者では、グルクロン酸抱合活性が低下し、この酵素の基質となる医薬品の副作用発生の原因となる恐れは大いにある。しかし、クリアランスのばらつきの大きさや平均値の人種間差への寄与は小さいと考えられる。

UGT1A1*6 の発生頻度については、日本人では有意に高いことが判明した。*In vitro* による組み換え実験では、UGT1A1*6 の SN-38 のグルクロン酸抱合能は野性型のほぼ 50%であったが、⁷⁾ イリノテカンを投与された患者においては、dose-limiting

events を発生させる頻度は野性型と有意な差はなかったという報告がある。³⁾ 但し、基質による相違もあることから、このような大きな発現頻度の人種差は、医薬品によってはばらつきの大きさの原因となり得る。

本年度は、UGT1A1 の 3 カ所の変異についてのみ検討したが、UGT1A の遺伝子の変異の幾つかは連鎖している可能性が示唆されているので、⁹⁾ UGT1A のハプロタイプの人種差など、今後さらに検討が必要である。

E. 結論

UGT1A1 の遺伝子多型には人種差が存在する。この人種差は、UGT1A1 の基質となる原薬及び活性代謝物の暴露の平均値及びばらつきの大きさの人種差の原因になり得る。今後、さらに、解析試料数を増やし、今回検討した部位での変異の発現頻度の人種差に関して最終的な結論を得る予定である。また、UGT1A の遺伝子の変異の幾つかは連鎖している可能性が示唆されているので、UGT1A のハプロタイプの人種差など、今後さらに検討が必要であると考えられる。

今回、UGT1A1 のエクソン 1 において新たに Pro229Leu の変異を見つけた。この変異は UGT1A1*27 と同一のポジションで生じる、異なる塩基への変換である。現在、この変異については、ダイレクトシーケンス法によって確認作業中であり、もし、新規 SNP であることが確認された場合には、その機能解析が必要となる。

参考文献

- 1) W.E. Evans et al., Science, 286, 487-491 (1999).
- 2) L. Iyer et al., Pharmacogenomics J., 2, 43

- (2002). なし
- 3) M. Ando et al., *Cancer Res.*, **60**, 2921(2000). 2. 実用新案登録
なし
- 4) F. Innocenti et al., *Pharmacogenetics*, **12**, 725 (2002). 3. その他
特になし
- 5) R.H. Tukey & C.P. Strassburg, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 581 (2000).
- 6) L. Iyer et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **65**, 576 (1999).
- 7) J-F Gagne et al., *Mol. Pharmacol.*, **62**, 608-617 (2002).
- 8) M. Ronaghi et al., *Anal. Biochem.*, **242**, 84-89 (1996).
- 9) J. Sugatani et al., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **292**, 492 (2002).
- 10) E. Beutler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 8170 (1998).
- 11) K.Y. Fertrin et al., *Am. J. Med. Gen.*, **108**, 117 (2002).
- 12) O. Koiwai et al., *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 1183-86 (1995).
- 13) K. Yamamoto et al., *J. Hum. Genet.*, **43**, 111-114 (1998).

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

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