

Fig. 1 Effects of sample sizes on the confidence intervals of p

-*..... limits for 0.2 of estimated p
- ▲----- limits for 0.1 of estimated p
- ◆----- limits for 0.05 of estimated p

Table 1 Sample sizes required for detecting the difference in allele frequency p between two populations ($\alpha=0.05$, $\beta=0.1$)

p in a population	p in another population	Sample size
0.01	0.05	280
0.01	0.10	90
0.05	0.15	160
0.10	0.20	200
0.20	0.30	330
0.20	0.40	90
0.30	0.40	350
0.30	0.50	100

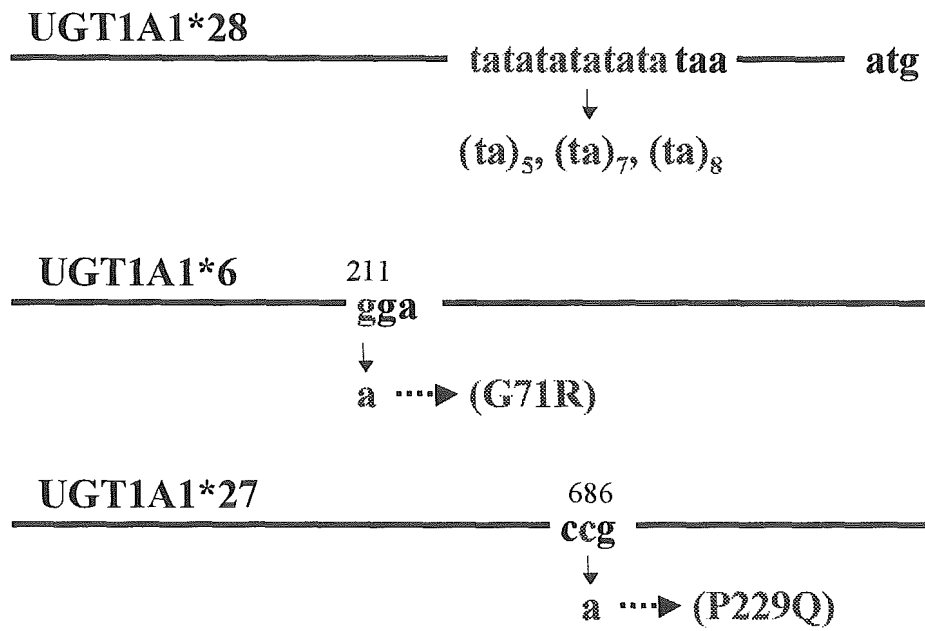
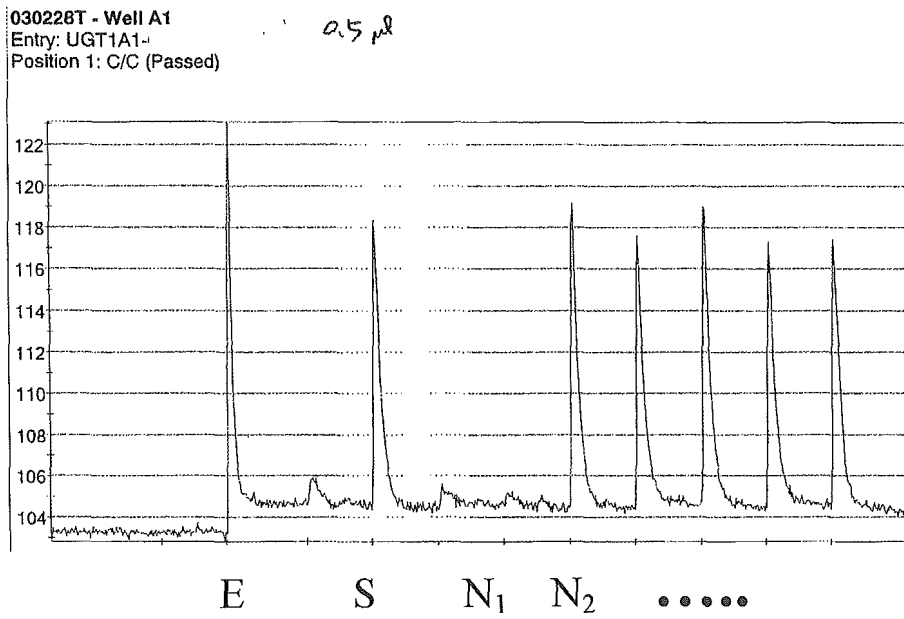


Fig. 2 Positions and sequences of UGT1A1 in the promoter region and exon 1 related to three genotypes

a)



b)

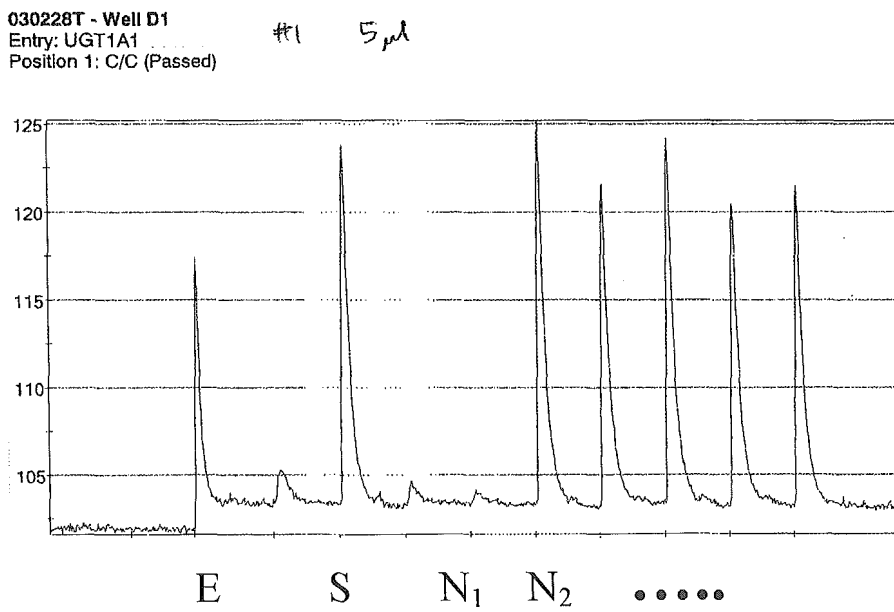


Fig. 3 Effect of volume of DNA solution on the results

a) result of 0.5 μ L DNA solution

b) result of 5 μ L DNA solution

Table 2 Allele frequencies of UGT1A1*28 among three different ethnic groups

Ethnic Group \ Type	Caucasian ^{*1}	African-American ^{*2}	Japanese ^{*3}
(ta) ₅	0.000 (0, 0.01) ^{*4}	0.064 (0.03, 0.07)	0.000 (0)
(ta) ₆	0.644 (0.61, 0.66)	0.489 (0.47, 0.52)	0.872 (0.84, 0.67)
(ta) ₇	0.355 (0.38, 0.32)	0.426 (0.43, 0.41)	0.128 (0.16, 0.33)
(ta) ₈	0.000 (0, 0.01)	0.021 (0.07, 0.01)	0.000 (0)

*1 n=90, *2 n=94, *3 n=196

*4 Values in parentheses are frequencies reported by E. Beutler^{R8)} and K.Y. Fertrin^{R9)}.

The reported values shown in cells for Japanese were values for Asian and Indians in Brazil.

Table 3 Allele frequencies of UGT1A1*6 among three different ethnic groups

Ethnic Group \ Type	Caucasian ^{*1}	African-American ^{*2}	Japanese ^{*3}
Wild	1.000	1.000	0.842
Variant	0.000	0.000	0.158

*1 n=70, *2 n=80, *3 n=196.

Table 4 Allele frequencies of UGT1A1*27 among three different ethnic groups

Ethnic Group \ Type	Caucasian ^{*1}	African-American ^{*1}	Japanese ^{*2}
Wild	1.000	0.990	1.000
Variant (C→A)	0.000	0.000	0.000
Variant (C→T)	0.000	0.010	0.000

*1 n=96, *2 n=196.

分担研究報告書

CYP3A の遺伝子多型と人種差に関する研究
分担研究者 千葉 寛 千葉大学大学院教授

研究要旨

初年度である平成 14 年度は、本研究で使用するゲノムが、白人種、黒人種、日本人の一般的な母集団であることを確認するため、まず、52 例の白人種、54 例の黒人種、56 例の日本人について CYP3A4*1B 変異を解析し、これまでに報告されている変異頻度と比較した。CYP3A4*1B の解析は polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法により行った。その結果、CYP3A4*1B の遺伝子頻度は、白人種、黒人種、日本人においてそれぞれ、3.85、71.3、0%であり、これまでの結果と良く一致することが示された。このことより、本研究で使用する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。次に、迅速な変異検出法として denaturing HPLC 法による DNA フラグメント解析法の検討を行った。変異型と野生型を区別する方法を確立するため、まず、野生型フラグメントを含むベクターと site-directed mutagenesis 法により変異を導入したベクターを構築した。平成 14 年度は、CYP3A4*2, *4, *8, *11, *12, *13, *16, *17 の 8 種の変異導入ベクターとそれぞれの野生型ベクターを構築した。

研究協力者

千葉大学大学院薬学研究院薬物学 助手 小林カオル

A. 研究目的

CYP3A4 は、多くの医薬品の代謝に重要な役割を果たす酵素であるが、発現量および活性には大きな個人差が存在する。個人差を生ずる原因の一つとして遺伝子多型の存在が示唆されているが、これまでに、報告されている CYP3A4 に関する変異遺伝子の発現頻度の多くは白人種について解析されたものであり、日本人や黒人種に関する情報は極めて少ない。そこで、白人種、黒人種、日本人のゲノムを対象とし、CYP3A4 遺伝子について変異遺伝子の発現頻度を解析し、比較することを目的とした。CYP3A4 遺伝子の翻訳開始点より 392 bp 5'-上流の変異である CYP3A4*1B は、その発現頻度に人種差が存在することが示唆されている変異である。そこで、初年度である平成 14 年度は、まず、CYP3A4*1B について解析し、本研究で使用するゲノムが、白人種、黒人種、日本人の一般的な母集団であることを確認することとした。さらに、白人種での発現頻度は低いものの活性を低下させる可能性が考えられる 8 種の変異 (*2, *4, *8, *11, *12, *13,

*16, *17) を denaturing HPLC 法により解析するため、それぞれの変異を導入したベクターと野生型ベクターを構築することを目的とした。

B. 研究方法

CYP3A4*1B は、PCR-RFLP 法により解析した。すなわち、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、得られた PCR 産物を Pst I により制限酵素処理することにより変異の有無を調べた。

8 種の変異 (*2, *4, *8, *11, *12, *13, *16, *17) は、exon 5 に*4 と*8、exon 7 に*2、*16、*17、exon 11 に*11、*12、*13 が存在する。そこでまず、野生型ゲノム DNA を鋳型とし、exon 5、7、11 をそれぞれ PCR により増幅し pGEM-T ベクターにクローニングすることにより野生型ベクターを作成した。これら野生型ベクターを鋳型とし、site-directed mutagenesis 法によりそれぞれの変異を導入したベクターを作成した。野生型ベクターおよび変異導入ベクターの配列はキャピラリーシーケンス法により確認した。構築した変異導入ベクターの

うち、CYP3A4*4 および CYP3A4*8 に関しては、WAVE system を用いた denaturing HPLC 法による変異解析法の検討を行った。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム検体の収集と解析には「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と提供者の同意を得て行った。日本人試料に関しては、連結不可能匿名化した。白人および黒人のゲノム DNA は研究用に市販されている倫理的に問題のないものを用いた。

C. 研究結果

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

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

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. 健康危険情報 なし

G. 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: 665-73.

H. 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

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	30	1201-5	2002
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	505	83-5	2002
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	63	889-96	2002
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
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	37	665-73	2003
Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, et al.	Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: Consequences for pravastatin pharmacokinetics	Clin Pharmacol Ther		In press	2003

20021002

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
P26「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください