

別添2

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 千葉 寛

平成16年（2004年）3月

別添 3

目 次

I. 総括研究報告	
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	1
千葉 寛	
II. 分担研究報告	
A. 横紋筋融解症	
1) スタチンによる横紋筋融解症の原因遺伝子と SNP の同定	15
千葉 寛	
2) 横紋筋融解症患者 DNA 採取ネットワークの確立と実施	29
上田志朗	
B. QT 延長症候群	
1) 薬剤誘起性 QT 延長症候群の遺伝子解析に関する研究	36
田中敏博	
2) 薬剤性 QT 延長	38
大江 透	
3) 薬剤誘起性 QT 延長症候群の遺伝子解析に関する研究	40
小川 聡	
4) 運動負荷による先天性 QT 延長症候群の遺伝子型の推定に関する研究	42
清水 渉	
5) 薬物誘発性 QT 延長症候群の遺伝子解析に関する研究	45
中谷晴昭	
C. Stevens-Johnson 症候群	
1) 薬剤誘起性 Stevens-Johnson 症候群の遺伝子解析	51
白川太郎	
2) 小児の Stevens-Johnson 症候群－成人例との比較検討	54
橋本公二	
3) 薬剤誘起性 Stevens-Johnson 症候群	59
伊崎誠一、川久保洋	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	63
IV. 研究成果の刊行物・別刷	69

別添4

I 総括研究報告

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

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。第2年度は、DNA 試料収集を継続して行うと共に、集まった試料の遺伝子解析を行った。第3年度も DNA 試料収集を継続して行うと共に、集まった試料の遺伝子解析を行い、副作用症例群に多いことが明らかになった SNP については機能解析を合わせて行った。その結果、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 *OATP-C*15* 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。さらに、*15 を HEK293 細胞に導入発現させることにより、*15 がプラバスタチン及びアトルバスタチンの取り込み能を著しく低下させることを明らかにした。これらの結果より、*OATP-C*15* 保有者はプラバスタチンまたはアトルバスタチンの肝臓への取り込みが低下し、循環血中から筋組織に暴露されるこれらのスタチンの量が野生型の遺伝子を持つ患者よりも多くなるため横紋筋融解症を発症する危険性が高くなるものと考えられた。薬剤性 QT 延長症候群については、2 次性 QT 延長症候群と診断された患者（45 症例）のゲノム DNA サンプルを用いて *KCNQ1* をはじめとする 12 遺伝子のアミノ酸変化を伴う 27 の SNPs について解析を行った。その結果、ピルメノールが原因で QT 延長を起こした患者の *KCNK6* の 775G>A について Bonferoni の補正後も有意差 ($P < 0.05$) が得られた。Stevens-Johnson 症候群については Stevens-Johnson 症候群の患者群に有意に高い SNP を *FASL* 遺伝子の promoter 領域に見いだした。これまでに、Stevens-Johnson 症候群とその進行した病態と考えられている toxic epidermal necrolysis の患者では *S-FASL* が高いことが明らかにされており、今回見いだされた *FASL* の -844C/T は *FASL* の発現量に影響を与えるとの報告があることから、この SNP が Stevens-Johnson 症候群の発症に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。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

上田志朗

千葉大学薬学研究院教授

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

清水 渉
国立循環器病センター心臓血管内科医長

中谷晴昭
千葉大学大学院医学研究院教授

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、DNA 試料収集チーム及び機能解析グループ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、小川、清水が、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 3 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、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。SN が機能に与える影響の解析に関しては、横紋筋融解症を千葉が、QT 延長に関しては中谷が担当した。

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

先天性横紋筋融解症に関連するエネルギー産生系遺伝子として、Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD), Carnitine palmitoyltransferase II (CPTII), Myophosphorylase (PYGM), Lactate dehydrogenase-A (LDHA) の 4 遺伝子を、薬物動態関連遺伝子としては、HMG-CoA 還元酵素阻害薬の動態に関係している酵素とトランスポーターとして、Organic anion

transporting polypeptide-C (OATP-C), Multidrug resistance protein 1 (MDR1), Multidrug resistance protein 2 (MRP2), CYP3A4 の 4 遺伝子を候補遺伝子としてスタチンを服用中、横紋筋融解症の疑いありと診断された患者 (症例群) およびスタチンを服用しても筋肉症状の現れなかった患者 (対照群) を対象に遺伝子解析を行った。

対象となった患者は、千葉大学医学部付属病院とその関連病院を受診した患者で、高コレステロール血症のためスタチンを服用中、横紋筋融解症の疑いありと診断された患者 10 人 (症例群) およびスタチンを 1 年以上服用しても筋肉症状の現れない患者 26 人 (対照群) であり、横紋筋融解症の診断は、本研究に先立ち作成された診断基準に基づいて行われた (平成 13 年度研究分担研究報告書)。

解析した箇所は、これまでに報告されている変異を中心に CPTII については 21 箇所、VLCAD については 36 箇所、PYGM については 42 箇所、LDHA については 7 箇所の変異を解析した。同様に、OATP-C については 16 箇所、MDR1 については日本人で報告のある 3 箇所の SNPs、MRP2 では日本人 DJS 患者で報告されている 6 箇所の mutation および健常日本人で報告されている 3 箇所の SNPs、CYP3A4 では 18 箇所の coding 領域の既知変異を解析した。解析はダイレクトシーケンシング法または PCR-RFLP 法により行った。

まず、エネルギー産生系遺伝子については、VLCAD の G128A の変異が検出された以外は症例群でエネルギー産生系遺伝子に変異は検出されなかった。また、VLCAD の G128A についても、genotype 頻度、アレル頻度に症例-対照間で差は認められなかった。

同様に、薬物動態関連遺伝子についても日本人 Dubin-Johnson Syndrome 患者で認め

られる MRP2 の 6 箇所の変異については、症例群で検出されず、唯一症例群で検出された健常日本人で報告されている nonsynonymous 変異である G1249A の多型についても症例-対照間で頻度に差は認められなかった。また、CYP3A4 についても CYP3A4*18 が症例および対照群で各々 1 例 heterozygote で検出されたが、症例および対照群におけるアレル頻度に有意な差は認められなかった。CYP3A4*18 以外の変異は症例群では見いだされなかった。

それに対し、OATP-C については症例群に A388G, T521C, C1007G の変異が検出され、C597T については、プラバスタチン、アトルバスタチン服用患者 (症例 6 例、対照 22 例) について比較を行った場合、症例群のアレル頻度 (0.500) が対照群 (0.114) に比較して有意 ($P=0.003$) に高い結果が得られた。

OATP-C には現在までに 16 種のハプロタイプが報告されている。そのため、連鎖を考慮した解析を行うためハプロタイプを決定し、ハプロタイプ、ディプロタイプ頻度を求めた。その結果、*1a/*15, *1b/*15 の頻度が症例群で高い傾向が認められ、ハプロタイプ頻度で比較すると、OATP-C*15 の頻度が症例群 (0.500) で対照群 (0.114) と比較して有意に高かった ($P=0.01$)。さらに、OATP*15 を 1 アレル以上有する患者の頻度を比較したところ、症例群 (0.833) における OATP-C*15 の保持率が対照群 (0.182) に比較して有意に高胃という結果が得られた ($P=0.002$, Odd's ratio=22.5, 95%CI=2.03 - 249)。

これらの結果から、遺伝子解析の結果、プラバスタチンまたはアトルバスタチン服用の患者群で OATP-C の *15 が有意に高く、まれな変異 (C1007G) が患者群に一例認められたことから、*15 に含まれる 2 つの cSNP (388G, T521C) と C1007G の全組み合わせのアレル変異体を作製しスタチンの取り込

機能を各変異体間で比較した。その結果、OATP-Cを一過的に発現させた Hek293 細胞におけるプラバスタチン、アトルバスタチン及びセリバスタチンの輸送活性は T521C の変異により顕著に低下(野生型の 1/6)したが、シンバスタチンの輸送活性は OATP-C の変異による影響を受けなかった。これは、シンバスタチンの細胞膜透過過程において、単純拡散が主要な輸送を占め、OATP-C を介した輸送の寄与が小さいためと考えられた。一方、プラバスタチンとアトルバスタチンの速度論的解析結果から、変異による輸送能低下は、基質親和性 (K_m) の変化では無く、経細胞輸送に機能するたん白量 (V_{max}) の変化によるものであること、さらに、免疫組織化学染色の結果より、T521C の変異による細胞膜への OATP-C たん白の移行の低下が確認されたことから、*15 による輸送活性低下はソーティング異常が原因と考えられた。

次に、MDR1 についてアミノ置換を伴う C1236T, G2677T/A, C3435T に関して頻度を求めたが、症例、対照間の頻度に有意な差は認められなかった。しかし、2677A のアレル頻度は、シンバスタチンまたはアトルバスタチン服用患者(case, n=6, control, n=8)に限定して解析した場合、両群間で頻度が異なる傾向が認められた(症例 0.333, 対照 0.000; Table 12)。2677A アレルを1つ以上有する患者とそうでない患者の頻度は症例-対照間で有意に異なっており、2677A が脂溶性スタチンによる横紋筋融解症に何らかの影響をおよぼしている可能性が示唆された。

2) 薬剤性 QT 延長症候群

KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, KCNA10, KCNJ11, KCNK6, ADRB1, SLC18A1, SLC18A2, SLC6A2 の計 12 遺伝子で同定されているアミノ酸変化を伴う SNP 計 27 箇所について、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 45 症例を用いてタイピングを行った。その結果、総ての症例のアレル頻度と対照群の頻度(文献値)を比較した場合、P 値が 0.05 より低い SNPs が一つ見いだされたが Bonferoni の補正後は有意差は消失した。

一方、不整脈を惹起した原因薬剤別 SNP の頻度を対照群と比較した場合、P 値が 0.05 より低い SNPs が 9 個見いだされた。これらの内 4 個の SNPs は Bonferoni の補正後も比較的低い (0.1 以下) P 値を示し、ピルメノールが原因で QT 延長を起こした患者の KCNK6 の 775G>A については Bonferoni の補正後も有意差 ($P < 0.05$) が得られた。

3) Stevens-Johnson 症候群

現在までに得られた 28 症例のうち、15 症例を対象に約 30 の候補遺伝子の SNP 解析を行い、SNP 一覧表を作成した。その中で特に先行研究で注目されている FASL 遺伝子の promoter 領域にある -844C/T 変異と SJS との関連が見られた ($p = 0.034$, Fisher's exact test)。そのため、解析が可能であった総ての症例 (26 症例) について検討を行ったところ、対照群と比較して有意に -844T アレルが多い結果が得られた。

D. 考察

1) 薬剤性横紋筋融解症

今回の結果より、プラバスタチンまたはアトルバスタチン服用患者における OATP-C*15 の頻度が症例群で有意 ($P = 0.01$) に高いこと、OATP-C*15 を 1 アレル以上有する患者の比率が症例群で有意 ($P = 0.002$, $OR = 22.5$, $95\%CI = 2.03 - 249$) に高いことが明らかとなった。さらに OATP-C*15 の一過性発現細胞におけるプラバスタチン、アトルバスタチンの輸送活性は野生型の約 1/6 に低下していたことから*15 を持つ患者では、プラバスタチン及びアトルバスタチンの排泄

臓器である肝臓への取り込みが低下している可能性が示唆された。実際、協力研究者である家入らは健常人におけるプラバスタチン経口投与時の AUC は、OATP-C*1b/*1b に比較して OATP-C*15/*15 で 2.5 倍、OATP-C*1b/*15 で約 1.5 倍大きいことを明らかにしている。これらの結果から OATP-C*15 を持つ患者がプラバスタチンなどのスタチンを服用した場合、肝臓への取り込みが低下しているため循環血中から筋組織に暴露されるスタチンが野生型の遺伝子を持つ患者よりも高くなり、横紋筋融解症を発症する危険性が高まる可能性が考えられた。

一方、シンバスタチンまたはアトルバスタチン服用患者において MDR1 の 2677A 頻度が症例群で高い傾向が認められ、2677A を 1 アレル以上有する患者は症例群で有意に多かった($P=0.024$)ことから、MDR1 2677A とシンバスタチンまたはアトルバスタチンによる横紋筋融解症との関連性がある可能性が示唆された。本研究では症例数が十分でなく wild type(G)と mutant(T/A)を対象として行った HWE は成立していたものの、3 アレルを対象として HWE を確認できなかった。従って今回認められた 2677A 変異と横紋筋融解症の関連性については、偶然である可能性もあり、さらに多くの症例を収集して確認する必要がある。

横紋筋融解症との関連の示唆された G2677A/T は各々 Ala 893 から 893Thr、または 893Ser へのアミノ酸置換を伴う。Ala893 は MDR1 蛋白の膜貫通ドメイン 10(TM10)上にあり細胞内ドメイン 5(ICD5)に近接している。MDR1 の基質認識に重要と考えられる領域は ATP 結合領域、細胞内外ループにも認められるが、膜貫通領域である TM4-6, TM10-12 に集中している。実際、TM10 上の Pro866 を Ala に置換することにより、Vinblastin に対す

る抵抗性は変化しないが Colchicine 等への抵抗性およびトランスポート活性が消失することが報告されている。Pro は膜結合蛋白に比較してトランスポーターの TM に多く認められることから、その輸送能の発現に必要なのではないかと考えられている。膜貫通領域にある Ala から Thr または Ser へのアミノ酸置換がトランスポート活性に与える影響については報告がない。Ala893 は細胞内ドメインにも近接しているため、これが細胞内に面していた場合、サイトゾル中のキナーゼによるリン酸化を受け、活性が変動する可能性も考えられる。また蛋白として合成された後、膜にソーティングされる際にリン酸化を受けて分解されやすくなる可能性も考えられる。また膜内でのコンホメーションが変わる可能性も考えられる。これまでに Ala893Ser/Thr のリン酸化に関して検討した報告はない。いずれにしても、OATP-C の一過的発現系を用いた今回の検討結果から、シンバスタチンの輸送に OATP-C は関係していない可能性が示唆されており、シンバスタチンをはじめとする脂溶性スタチンには OATP-C ではなく、脂溶性物質の排泄に関わるトランスポーターである P-糖蛋白の機能変化が関係している可能性が示唆されたことは興味深い。

最後に、これまで 2677A/T は 1 つの mutation としてまとめて評価されてきたが、本研究結果から 2677A と T は異なる phenotype を示す可能性が示唆された。最近、Inflammatory Bowel Disease(IBD)と MDR1 の Ala893(G2677)の関連性について比較的大規模な研究成果が報告されている。この報告の中で、2677A は IBD 患者に継承されていないが 2677T の頻度は case/control 間で差がないことが示されている。このことから、2677A と 2677T は異なる phenotype を示す可能性が推察され、今後 2677A が MDR1 発現量、トランスポート

活性、他の遺伝子との連関などに及ぼす影響を2677Tとは別に評価する必要があるものと考えられた。

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、不整脈を惹起した原因薬剤別に見た場合、Bonferoni の補正後も P 値が比較的低い SNPs が4個見いだされ、その内の一つであるピルメノールが原因で QT 延長を起こした患者の KCNK6 の 775G>A については Bonferoni の補正後も有意差 ($P<0.05$) が得られた。しかし、患者数が5と絶対数が少なく、この結果が true positive か、false positive なのかはサンプル数を追加して統計学的信頼性をあげた検索をまつ必要があるものの今後機能解析を行いその結果と合わせて薬剤性 QT 延長症候群の原因となる可能性について検討する意義があるものと考えられた。

3) Stevens-Johnson 症候群

今回の検討により、FASL 遺伝子の promoter 領域にある-844C/T 変異と SJS に有意な関連が見いだされた。FASL は FAS 抗原に結合することにより FAS 抗原発現細胞にアポトーシスを引き起こす ligand であり、TNF ファミリーに属する膜たんぱく質として活性化 T 細胞に発現している。FASL はプロテアーゼによって切断され可溶性 FASL (S-FASL) となって血中や組織中に移行する。これまでに、Stevens-Johnson 症候群とその進行した病態と考えられている toxic epidermal necrolysis の患者では S-FASL が高いことが明らかにされており、ヒトイムノグロブリンの静注が FAS を介した toxic epidermal necrolysis の患者における皮膚の壊死の進行を阻止したとの報告もある。今回見いだされ

た FASL の-844C/T は FASL の発現量に影響を与えるとの報告があることからこの SNP が Stevens-Johnson 症候群の発症に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

E 結論

1) 薬剤性横紋筋融解症

OATP-C*15 保有者は基質であるプラバスタチンまたはアトルバスタチンの肝臓への取り込みが低下し、循環血中から筋組織に暴露されるこれらのスタチンの量が野生型の遺伝子を持つ患者よりも多くなり、横紋筋融解症を発症する危険性が高くなるものと考えられた。

2) 薬剤性 QT 延長症候群

2 次性 QT 延長症候群と診断された患者 (45 症例) のゲノム DNA サンプルを用いて KCNQ1 をはじめとする 12 遺伝子のアミノ酸変化を伴う 27 の SNPs について解析を行った。その結果、ピルメノールが原因で QT 延長を起こした患者の KCNK6 の 775G>A について Bonferoni の補正後も有意差 ($P<0.05$) が得られた。今後、この SNP が機能に与える影響を検討し、薬剤性 QT 延長症候群の原因遺伝子である可能性を明らかにしたい。

3) Stevens-Johnson 症候群

Stevens-Johnson 症候群の患者群に有意に高い SNP が FASL 遺伝子の promoter 領域に見いだされた。これまでに、Stevens-Johnson 症候群とその進行した病態と考えられている toxic epidermal necrolysis の患者では S-FASL が高いことが明らかにされており、今回見いだされた FASL の-844C/T は FASL の発現量に影響を与えるとの報告があることから、この SNP が Stevens-Johnson 症候群の発症に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

F 健康情報 なし

G 研究発表

1) 学会発表

千葉 寛 横紋筋融解症 日本臨床薬理学会、横浜、平成15年12月

森本 かおり, 上田 志朗, 関 直人, 井川 佳之, 亀山 良雄, 清水 敦子, 大石 智春, 細川 正清, 千葉 寛 HMG-CoA 還元酵素阻害剤による横紋筋融解症の候補遺伝子多型解析 日本薬物動態学会 札幌 平成15年10月

亀山 良雄¹⁾²⁾, 山下 恵子¹⁾, 小林 カオル¹⁾, 細川 正清¹⁾, 千葉 寛¹⁾ 変異型(A388G, T521C, C1007G)OATP-C 発現細胞を用いた HMG-CoA 還元酵素阻害薬の細胞膜輸送能の解析 日本薬物動態学会 札幌 平成15年10月

福田早苗, 白川太郎, 石川裕樹, 相場勇志, 古賀泰裕: アレルギー疾患と腸内細菌透過性に関する研究, 第13回日本疫学会, 福岡, 2003. 1.

白川太郎: アレルギーの予防を考える(学術講演), 第26回日本位学会総会, 福岡シークホテル, 2003. 4. 4-6

玉利真由美, 白川太郎: 気管支喘息関連遺伝子への患者一対象研究を中心に(シンポジウム), 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会, パシフィコ横浜, 2003. 5. 12-14.

井手昌洋, 嶋田貴志, 榎本雅夫, 白川太郎, 安枝 浩: スギ花粉抗原の1型

アレルギーモデルに対する乳酸菌FK-23菌抽出物(LFK)の効果, 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会, パシフィコ横浜, 2003. 5. 12-14.

三邊武幸, 三好 彰, 程 雷, 殷 敏, 時 海波, 白川太郎: アレルギー性鼻炎と大気汚染, 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会, パシフィコ横浜, 2003. 5. 12-14.

福田早苗, 白川太郎: プロバイオティクスを用いたアレルギー予防試験に関する取り組み—熊本県小国町研究—, 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会, パシフィコ横浜, 2003. 5. 12-14.

白川太郎: 新しい食の科学、フードバイオロジー —機能性食品によるアレルギー予防をモデルに— (特別講演), 第49回日本生理人類学会, 九州大学百周年記念講堂, 2003. 5. 16-17.

白川太郎: 職業・環境によるアレルギー疾患の遺伝的背景 (特別講演), 第34回日本職業・環境アレルギー学会, 栃木県総合文化センター, 2003. 6. 27-78.

白川太郎: 遺伝要因と環境要因の相互作用: アレルギー疾患をモデルに (特別講演), 第10回日本免疫毒性学会, 相模原市民文化会館, 2003. 9. 25-26.

Chiba K, Pharmacogenomics of statin-induced rhabdomyolysis. Inaugural AASP Conference, Beijing China, 2004

Shimizu W: Scientific Symposia, 12th World

Congress on Cardiac Pacing and Electrophysiology (ICPES), Hong Kong, China, 2003. 2.

Shimizu W: Special Symposia, American Heart Association (AHA) 2nd Asia Pacific Scientific Forum: New Discoveries in Cardiovascular Disease and Stroke: Bench to Bedside to Community, Honolulu, USA, 2003 6.

Shimizu W: Lecture, 2nd Brugada Consensus Conference, Lake Placid, USA, 2003. 9.

Shimizu W: Symposium, The 53rd Annual Scientific Sessions of the American College of Cardiology (ACC), New Orleans, USA, 2004. 3.

Yamasaki K, Dai X, Nanba D, Shiraishi K, Yahata Y, Tokumaru S, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Higashiyama S, Hashimoto K: PLZF regulates and suppresses melanoma proliferation and tumor growth. *International Investigative Dermatology* 2003. Miami Beach May 2003, USA

Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M: In vitro keratinocyte dissociation assay to evaluate blister-inducing activity of pemphigus IgG autoantibodies. *International Investigative Dermatology* 2003. Miami Beach May 2003, USA

Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Hashimoto K: Novel role of angiotensin II in fibroblasts: induction of

fibroblast migration by angiotensin II via HB-EGF-mediated EGF receptor transactivation. *International Investigative Dermatology* 2003. Miami Beach May 2003, USA

Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Higashiyama S, Hashimoto K: Keratinocyte-specific HB-EGF-deficient mice show marked retardation of skin wound healing. *International Investigative Dermatology* 2003. Miami Beach May 2003, USA

Nanba D, Shirakata Y, Nakanishi Y, Hieda Y, Ishiguro H, Higashiyama S, Hashimoto K: Epidermal hyperplasia and impaired morphogenesis of hair follicles in mice overexpressing a soluble form of heparin-binding EGF-like growth factor. *International Investigative Dermatology* 2003. Miami Beach May 2003, USA

Dai X, Yamasaki K, Yahata Y, Tokumaru S, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K: All trans-retinoic acid induces production of IL-8 in human keratinocytes via increased phosphorylation of I κ B α in the NF κ B pathway. *International Investigative Dermatology* 2003. Miami Beach May 2003, USA

Tohyama M, Shirakata Y, Yamasaki K, Sayama K, Tsuda T, Tan E, Hashimoto K: production of MIP-1 α /CCL3 is mediated via toll-like receptor 3 in human keratinocytes. *International Investigative Dermatology* 2003. Miami Beach May 2003, USA

Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Dai X, Sugai M, Ichijo H, Hashimoto K: Epidermal differentiation regulates the production of innate antimicrobial peptides in the skin. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA

Tokumaru S, Shirakata Y, Yamasaki K, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: EGF receptor transactivation by UV-irradiation is mediated via HB-EGF shedding in human keratinocytes. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA

Hashimoto K: Drug induced hypersensitivity syndrome (DIHS). 13th Korea-Japan Joint Meeting of Dermatology, Daejeon Oct 2003, Korea

2) 論文発表

Iida I, Miyata A, Trai M, Hirota M, Akimoto M, Higuchi S, Kobayashi K, Chiba K: Catalytic roles of CYP2C9 and its variants (CYP2C9*2 and CYP2C9*3) in lornoxicam 5'-hydroxylation. Drug Metab Disp 32:7-9, 2004.

Senda C, Toda S, Tateishi M, Kobayashi K, Igarashi T, Chiba K. Mexiletine carbonyloxy beta-D-glucuronide: a novel metabolite in human urine. Xenobiotica. 33:871-84, 2003

Suzuki A, Iida I, Hirota M, Akimoto M, Higuchi S, Suwa T, Tani M, Ishizaki T, Chiba K: CYP isoforms involved in the metabolism of clarithromycin in vitro: Comparison between the identification from disappearance rate and that from formation rate of metabolites. Drug Metab Pharmacokinet 18:104-113, 2003

Mimura N, Kobayashi K, nakamura Y, Shimada N, Hosokawa M, Chiba K. Metabolism of medoroxyprogesterone acetate (MPA) via CYP enzymes in vitro and effect of MPA on bleeding time in female rats in dependence of CYP activity in vivo. Life Sci 73:3201-12, 2003

Kobayashi K, Urashima K, Shimada N, Chiba K: Selectivities of human cytochrome P450 inhibitors toward rat P450 isoforms: study with cDNA-expressed systems of the rat. Drug Metab Dispos 31:833-36, 2003

Furihata T, Hosokawa M, Nakata F, Satoh T, Chiba K: Purification, molecular cloning, and functional expression of inducible liver acylcarnitine

hydrolase in C57BL/6 mouse, belonging to the carboxylesterase multigene family. Arch Biochem Biophys 416:101-9, 2003

Imai T, Yoshigae Y, Hosokawa M, Chiba K, Otagiri M. Evidence for the involvement of a pulmonary first-pass effect via carboxylesterase in the disposition of a propranolol ester derivative after intravenous administration. J Pharmacol Exp Ther.307:1234-42, 2003.

S. Ueda: Gold salts, D-penicillamine, and allopurinol. pp 307-324 in "Clinical Nephrotoxins", edited by M.E. De Broe et al. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,/ Boston/ London, 2003

Y. Kamijima, M. Mochizuki, S. Yamagata, N. Satoh, T. Ohta, T. Uruno, S. Ueda: Sex difference in the effect of aspirin on the prevention of coronary heart disease: A gender-based meta-analysis of randomized, placebo-controlled, double-blind trials. Japanese Journal of Drug Informatics Vo4 4:151-157, 2003

K.Sakata, K.Kashiwagi, S.Sharmin, S.Ueda, Y Irie, K..Igarashi : Increase in putrescine, amine oxidase, and acrolein in plasma of renal failure

patients. BBRC 305; 143-149, 2003

T. Fujii, Y. Hamano, S. Ueda, B. Akikusa, S. Yamasaki, M. Ogawa, H. Saisho, J.S. Verbeek, S Taki, T. Saito: Predominant role of Fc γ RIII in the induction of accelerated nephrotoxic glomerulonephritis. Kid Intern, Vol.64, 1406-1426, 2003

M.A.Ibrahim, N.Satoh, S.Ueda : Possible impact of nitric oxide on the antihypertensive effect of captopril and zaprinast. The International Journal Of Drug,Device & Diagnostic Research Vol.20 No.3 (2003)

Tomoko Terajima, Shin-ichi Yamagata, Nobunori Satoh, S.Ueda : Meta-analysis: Effect of ACE-Inhibitors on Outcomes in Patients with Renal Insufficiency. P&T, 28:98-112, 2003

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.

Shimizu W: Genotype-Specific Clinical Manifestation in Long QT Syndrome. Expert Review of Cardiovascular Therapy 1: 401-409, 2003

Takenaka K, Ai T, Shimizu W, Kobori A,

- Ninomiya T, Otani H, Kubota T, Takaki H, Kamakura S, Horie M: Exercise stress test amplifies genotype-phenotype correlation in the LQT1 and LQT2 forms of the long QT syndrome. *Circulation* 107: 838-844, 2003
- Shimizu W: Editorial comment, Gender difference and drug challenge in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 15: 70-71, 2004
- Sato T, Takizawa T, Saito T, Kobayashi S, Hara Y, Nakaya H.: Amiodarone Inhibits Sarcolemmal but not Mitochondrial K_{ATP} Channels in Guinea-Pig Ventricular Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 955-960, 2003
- Yamashita T, Ogawa S., Aizawa Y., Atarashi H., Inoue H., et.al.: Investigation of the optimal treatment strategy for atrial fibrillation in Japan The J-RHYTHM (Japanese Rhythm Management Trial for Atrial Fibrillation) study design. *Circ. J.* 67: 738-741, 2003
- Suzuki, M., Saito, T., Sato, T., Tamagawa, M., Miki, T., et al.: Cardioprotective effect of diazoxide is mediated by activation of sarcolemmal but not mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels in mice. *Circulation* 107: 682-685, 2003.
- Ohtsuka M., Takano H., Suzuki M., Zou Y., Akazawa H., et al.: Role of Na^+-Ca^{2+} exchanger in myocardial ischemia/reperfusion injury: evaluation using a heterozygous Na^+-Ca^{2+} exchanger knockout mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314: 849-53.2003
- Matsuura K., Nagai T., Nishigaki N., Oyama T., Nishi J., et al.: Adult cardiac Sca-1 positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 279: 11384-11391, 2004
- Ishida H., Higashijima N., Hirota Y., Genka C., Nakazawa H., et al.: Nicorandil attenuates the mitochondrial Ca^{2+} overload with accompanying depolarization of the mitochondrial membrane in the heart. *Naunyn- Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 369:192-197, 2004
- Sato T., Li Y., Saito T., Nakaya H.: Minoxidil opens mitochondrial K_{ATP} channels and confers cardioprotection. *Br. J. Pharmacol* 141: 360-366, 2004
- Shimada T, Cheng L, Ide M, Fukeda S, Enomoto T, Shirakawa T. Effect of lysed enterococcus faecalis FK-23 (LFK) on allergen-induced peritoneal accumulation of eosinophils in mice. *Clin Exp Allergy.* 2003;33:684-7.
- Ouchi K, Suzuki Y, Shirakawa T, Kishi F. Polymorphism of SLC11A1(formerly NRAMPI) gene confers susceptibility to Kawasaki disease.*J Infect Dis* 2003;187:326-9.
- Reisong G, Mao XQ, Enomoto T, Feng Z, Gloria-Bottini F, Bottini E, Shirakawa T, Sun D, Hopkin JM: An asthma-associated genetic variant of STAT6 predicts low burden of ascaris

worm infestation. *Genes Immun* 5:
58-62, 2004

Bottini N, Mao XQ, Borgiani P, Saccucci P,
Stefanini L, Greco E, Fontana L, Hopkin JM,
Shirakawa T: Genetic control of serum IgE
level; a study of lowmolecular weight protein
tyrosine phosphatase. *Clin. Genet.*
2003;63:228-231

Nakajima T, Ikura M, Okayama Y,
Matsumoto K, Uchiyama C, Shirakawa T,
Yang X, Adra C, Hirai K, Saitoh H:
Identification of granulocyte
subtype-selective receptors and ion channels
by using a high-density oligonucleotide
probe array. *J Allergy Clin Immunol*
113:528-535, 2004

Takeuchi S, Mandai Y, Otsu A, Shirakawa Y,
Nasuda K, Chinami M: Differences in
properties between human α A and
 α B-crystallin proteins expression in
Escherichia coli cells in response to cold and
extreme pH. *Biochem J* 375: 471-75, 2003

Nanba D, Mammoto A, Hashimoto K,
Higashiyama S.: Proteolytic release of the
carboxy-terminal fragment of proHB-EGF
causes nuclear export of PLZF. *J Cell Biol*
2003, 163:489-502

Iwamoto R, Yamazaki S, Asakura M,
Takashima S, Hasuwa H, Miyado K, Adachi
S, Kitakaze M, Hashimoto K, Raab G, Nanba
D, Higashiyama S, Hori M, Klagsbrun M,
Mekada E. Heparin-binding EGF-like
growth factor and ErbB signaling is essential
for heart function. *Proc Natl Acad Sci USA*
2003, 100:3221-6.

Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S,
Yamasaki K, Sayama K, Hanakawa Y,
Detmar M, Hashimoto K: Nuclear
translocation of phosphorylated STAT3 is
essential for VEGF-induced human dermal
microvascular endothelial cell migration and
tube formation. *J Biol Chem* 2003,
278:40026-31

Nakamura Y, Fukami K, Yu H, Takenaka K,
Kataoka Y, Shirakata Y, Nishikawa SI,
Hashimoto K, Yoshida N, Takenawa T.:
Phospholipase Cdelta(1) is required for skin
stem cell lineage commitment. *EMBO J*
2003, 22:2981-2991.

Masaki T, Fukunaga A, Tohyama M, Koda Y,
Okuda S, Maeda N, Kanda F, Yasukawa M,
Hashimoto K, Horikawa T, Ueda M: Human
herpes virus 6 encephalitis in
allopurinol-induced hypersensitivity
syndrome. *Acta Derm Venereol* 2003,
83:128-31

千葉 寛 「副作用を薬理ゲノミクスの
立場から考える」、*生体の科学* 54:393-8,
2003

森田 宏、中村 一文、大田恵子、森田
志保、三浦大志、斎藤 博則、草野 研
吾、江森 哲郎、大江 透、幡 芳樹、
水尾 浩三. 著明な T wave alternans 現
象を示した LQT1 の一家系. *心臓 in*
press.

中村 一文、三浦 大志、森田 宏、大
江 透:LQT/Brugada 症候群での遺伝子解
析の意義 *Cardiac Practice*

2003:14:335-341.

清水 渉: 新不整脈学: 南光堂, p.52-55;
p.339-343, 2003

清水 渉: 抗不整脈薬の新たな展開: 医
薬ジャーナル社, p.254-272, 2003

清水 渉: Medical Topics Series 不整脈
03: メディカルレビュー社, p. 80-91, 2003

清水 渉, 野田 崇, 田邊康子, 高木 洋,
里見和浩, 須山和弘, 栗田隆志, 相原直彦,
鎌倉史郎: 先天性QT延長症候群の遺
伝子型の推定と非浸透例の検出、心電図
23: 141-146, 2003

清水 渉, 相庭武司, 鎌倉史郎: QT延長
の功と罪 Prog Med 23: 1311-1318, 2003

清水 渉: Naチャンネル病におけるNaチ
ャネルブロッカーの役割. シリーズ『Na
チャンネルブロッカーを考える』診断と治
療 91: 1246-1251, 2003

清水 渉: チャンネル病. 特集「不整脈死を
防ぐ」Heart View 6: 63-68, 2004

中谷晴昭, 鈴木将, 植村展子, 佐藤俊明,
小倉武彦, 他: 心血管系におけるK_{ATP}
チャンネルの役割 心電図 23: S-3-3-S
-3-18, 2003

中谷晴昭: QT延長薬物の細胞電気薬理学
的評価法 日本薬理学雑誌 121: 384-392,
2003

中谷晴昭, 三木隆司, 清野進, 山田勝也,
稲垣暢也, 他: 各種臓器のATP感受性K⁺

チャンネルの構造と機能: 薬物制御による
QOLの向上をめざして日本薬理学雑誌
122: 243-250, 2003

中谷晴昭: ATP感受性K⁺チャンネルを標的
とした虚血・冠攣縮—心血管K_{ATP}チ
ャネル. 医学のあゆみ 分子標的薬 208:
388-392, 2004

中谷晴昭: イオンチャンネルのリモデリ
ング Cardiac Practise 14: 343-47,
2003

藤山幹子, 橋本公二: 薬剤誘発性過敏症
症候群 medicina 40:997-9, 2003

藤山幹子, 橋本公二: drug-induced
hypersensitivity syndromeとHHV-6 臨
床免疫 40:219-21, 2003

橋本公二: D I H Sの経緯と診断基準
医学のあゆみ 205:951-4, 2003

橋本公二: D I H Sとはなにか アレル
ギー・免疫 10:811-5, 2003

山崎研志, 白方裕司, 佐山浩二, 橋本公
二: 角化細胞の幹細胞 再生医学
40:218-225, 2003

藤山幹子, 橋本公二: 薬剤誘発性過敏症
症候群 アレルギー科 15:381-6, 2003

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

I. その他

第18回薬物動態学会において本研究成果は
薬物動態学会ベストポスター賞を受賞した。

別添5

II 分担研究報告

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）
分担研究報告書

スタチンによる横紋筋融解症の原因遺伝子と SNP の同定

分担研究者 千葉 寛 千葉大学大学院教授

研究要旨

スタチンによる横紋筋融解症の原因遺伝子と SNP を明らかにするため、先天性横紋筋融解症に関連するエネルギー産生系遺伝子として、Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD), Carnitine palmitoyltransferase II (CPTII), Myophosphorylase (PYGM), Lactate dehydrogenase-A (LDHA) の 4 遺伝子を、薬物動態関連遺伝子としては、Organic anion transportong polypeptide-C (OATPC), Multidrug resistance protein 1 (MDR1), Multidrug resistance protein 2 (MRP2), CYP3A4 の 4 遺伝子を候補遺伝子として case-control study を行った。対象はスタチンを服用中、横紋筋融解症の疑いありと診断された患者（症例群）およびスタチンを服用しても筋肉症状の現れなかった患者（対照群）とした。その結果、症例群の患者のいずれにおいても先天性横紋筋融解症の原因遺伝子の既知変異は見いだされず、薬物動態関連遺伝子についても、MRP2, CYP3A4 の多型に症例・対照間で頻度の差は認められなかった。しかし、プラバスタチンまたはアトルバスタチン服用患者における *OATP-C*15* の頻度 ($P=0.01$) が症例群で有意に高いこと、*OATP-C*15* を 1 アレル以上有するヒトの比率が症例群で有意 ($P=0.002$, $OR=22.5$, $95\%CI=2.03-249$) に高いことが明らかとなった。さらに *OATP-C*15* の一過性発現細胞におけるプラバスタチン、アトルバスタチンの輸送活性は野生型の約 1/6 に低下しており、免疫組織化学染色の結果より、T521C の変異による細胞膜への OATP-C たん白の移行の低下が確認されたことから、ソーティング異常により輸送活性が低下していることが明らかとなった。以上の結果より、*15 を持つ患者では、基質であるプラバスタチンまたはアトルバスタチンの肝臓への取り込みが低下し、循環血中から筋組織に暴露されるこれらのスタチンの量が野生型の遺伝子を持つ患者よりも多くなり、横紋筋融解症を発症する危険性が高まるものと考えられた。

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の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（スタチン）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。

これらの背景から、本研究ではスタチンによる横紋筋融解症の原因遺伝子と SNP を明らかにするため、先天性横紋筋融解症に関連するエネルギー産生系遺伝子として、Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD), Carnitine palmitoyltransferase II (CPTII), Myophosphorylase (PYGM), Lactate dehydrogenase-A (LDHA) の 4 遺伝子を、薬物動態関連遺伝子としては、HMG-CoA 還元酵素阻害薬の動態に関係している酵素とトランスポーターとして、Organic anion transportong polypeptide-C (OATPC), Multidrug resistance protein 1 (MDR1), Multidrug resistance protein 2 (MRP2), CYP3A4 の 4 遺伝子を候補遺伝子としてスタチンを服用中、横紋筋融解症の疑いありと診断された患者（症例群）およびスタチンを服用しても筋肉症状の現れなかった患者（対照群）を対象に遺伝子解析を行った。その結果、患者群で OATPC のハプロタイプである OATPC*15 が有意に高い、あるいは対照群に見いだされなかったまれな変異が患者群に見いだされたため、*15 をはじめとする患者群に認められた OATPC の変異が肝臓へのスタチンの取り込みにどのような影響を与えるかをこれらの変異遺伝子を Hek293 細胞に導入発現させ検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象