

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）を対象患者として解析を行った。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）。基準の概略は、スタチン系薬剤服用により急激に発症する筋肉の障害を認めること（四肢の脱力感、しびれ、筋肉痛、筋硬直、筋の腫脹）または／および血液中クレアチンキナーゼ（CK）、AST、ALT、ミオグロビンなどの顕著な上昇を認めること、および、血液生化学値に影響を及ぼすと考えられる因子—運動負荷、激しい咳、虚血、熱射病、筋疾患（代謝性筋疾患、筋ジストロフィー、皮膚筋炎、多発筋炎、ミトコンドリア障害など）、低 K 血症、高熱、意識障害、重篤な肝障害—を有する患者を除外することである。

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。なお、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。

## 2) 遺伝子解析

遺伝子解析は、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ス法または PCR-RFLP 法により行った。

OATP-C のハプロタイプはダイレクトシーケンスの結果を基に解析した。A388G および T521C の両方が heterozygote であった場合の \*1a/\*15 または \*1b/\*5 の判定は報告に従って行った。概略は、以下の通りである。521C(mt) と 521T(wt) に特異的なプライマーを用い、A388G と T521C を含む 1945 bp の領域を増幅した。この PCR 産物の A388G の多型を TaqI を用いた RFLP により解析した。521C(wt) プライマー (reverse) の配列は 5'-ATATTACCCATGAACA-3'、521T(mt) の配列 (reverse) は 5'-ATATTACCCATGAACG-3'、sense プライマーの配列は 5'-CATGTGGATATATGT-3' を用いた。RFLP の検出は、5% agarose gel を用いた電気泳動により行った。

ダイレクトシーケンス反応には CEQTM DTCS-Quick Start Kit (BECKMAN COULTER, Fullerton, CA, USA) を用いてサイクルシーケンス反応を行い、CEQTM 2000 XL DNA Analysis System (BECKMAN COULTER) により解析を行った。

## 3) 変異型 OATP-C 発現細胞を用いた解析

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 に患者群で認められた 3 つの cSNP、すなわち A388G、T521C 及び C1007G の全組み合わせのアレル変異体を Site-directed mutagenesis 法により作製し HEK293 及び HeLa 細胞に遺伝子導入した細胞を作成し、ス

タチンの取り込み能を各変異体間で比較した。

#### 4) 統計解析

男女比、年齢構成、genotype、アレル頻度について $\chi^2$ 検定を行った。有意差の判定は $P < 0.05$ であった場合とした。Odds比および95%信頼区間の算出には理論回帰モデルを用いた。

### C. 研究結果

#### 1) 患者の年齢と男女比

患者の年齢構成、男女比は全症例を対象とした場合でもプラバスタチンまたはアトルバスタチン服用患者群、シンバスタチンまたはアトルバスタチン服用患者群に分けて比較した場合でも群間で差は認められなかった。

#### 2) エネルギー産生系遺伝子の解析

エネルギー産生系遺伝子の解析結果を Table 1 に示した。VLCAD の G128A の変異が検出された以外、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。Hardie-Weinberg 平衡は両群で成立していた。

#### 3) 薬物動態関連遺伝子の解析

MRP2: 日本人 Dubin-Johnson Syndrome 患者で認められる 6 箇所の変異については、いずれも症例群で検出されなかった。また、健常日本人で報告されている nonsynonymous 変異の中では G1249A の多型が検出されたが、症例-対照間で頻度に差は認められなかった。対照群における G1249A のアレル頻度は、健常日本人 48 人を対象に調べた頻度(0.125)と近い値を示した。

CYP3A4: 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は、各々 0.083, 0.063 で

あり、頻度に有意な差は認められなかった ( $P=0.832$ )。それ以外の変異は症例群では見いだされなかった。

OATP-C: 症例群において、OATP-C のアミノ酸置換を伴う 16 箇所の既知 SNPs を調べた結果、A388G, T521C, C1007G の変異が検出され、その他 13 箇所の SNPs は全て wild type であった。症例群で変異が検出された SNPs の中で、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、A388G, C597T, C1007G ではアレル頻度に有意差は認められなかったが、T521C のアレル頻度(0.500)が対照群(0.114)に比較して症例群で有意に高かった ( $P=0.003$ ) (Table 2)。また、比較的稀な変異である C1007T (日本人におけるアレル頻度 1%) が症例群に 1 例 heterozygote で検出され、対照群には認められなかった。対照群の SNPs の頻度は、健常日本人における頻度と一致した。なお、変異が検出されたすべてのアレルにおいて Hardie-Weinberg 平衡が成立することを確認した。

ハプロタイプ解析: 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。ディプロタイプ頻度に症例、対照間で差は認められなかったが、\*1a/\*15, \*1b / \*15 の頻度が症例群で高い傾向が認められた。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 ( $P=0.01$ )。また、対照群のハプロタイプ頻度は健常日本人における頻度に近かった。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か

った ( $P=0.002$ ,  $\text{Odds ratio}=22.5$ ,  $95\%CI=2.03 - 249$ ; Fig1)。

MDR1: 検討した C1236T, G2677T/A, C3435T に関して症例、対照間の頻度に有意な差は認められなかったが、2677A のアレル頻度が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,  $n=8$ ) を対象として行った場合、症例-対照間で異なる傾向が認められた (症例 0.333, 対照 0.000; Table 12)。症例、対照各群における C1236T, C3435T の Hardy-Weinberg 平衡は成立していた。G2677A/T の Hardy-Weinberg 平衡は、A/T を 1 アレルとみなした場合成立するが、3 アレルでの平衡は例数が不足しているため計算できなかった。シンバスタチンまたはアトルバスタチン服用患者の対象群における C1236A の頻度 0.625 は健常日本人における頻度 0.65 とほぼ一致したが、2677A 頻度 0.000 が健常日本人の 0.12-0.22 に比較して低く、C3435T の頻度 0.625 も健常日本人における頻度 0.44-0.49 と若干異なる傾向が認められた。2677A アレルを 1 つ以上有するヒトとそうでないヒトの頻度は症例-対照間で有意に異なり (Fig.2,  $P=0.024$ )、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。

#### 4) 変異型 OATP-C 発現細胞を用いた解析

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、まれな変異である C1007G が患者群に認められたことから、\*15 に含まれる 2 つの cSNP、すなわち A388G, T521C 及び 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み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 (Fig 3)。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 (Figure 4)、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、ソーティング異常が輸送活性低下の原因と考えられた。

#### D 考察

候補遺伝子として、先天性横紋筋融解症の原因遺伝子から VLCAD, CPTII, PYGM, LDHA を、薬物動態関連遺伝子から OATP-C, MDR1, MRP2, CYP3A4 を選択し、スタチンによる横紋筋融解症との関連性について case-control study を行った。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なかった。また、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。なお、本研究の対象は日本人であったため、*OATP-C\*15* と横紋筋融解症との関連が検出されたが、欧米人においては 521C のみの変異から成る \*5 の頻度が高い (14%) ことが報告され、今回の結果から *OATP-C\*5* においても輸送能が低下していることが示されたことから、欧米人においては *OATP-C\*5* が横紋筋融解症との関連性に影響を及ぼす可能性があるものと考えられた。

一方、症例群でまれな SNP である C1007T が検出された。C1007T は第 7 膜貫通領域にあるアミノ置換を伴う SNP であり、機能へ影響を与える可能性が考えられたが、今回の結果から 1007T はプラバスタチンおよびアトルバスタチンの輸送能に影響を与えないことが示されたことから、1007T はスタチンによる横紋筋融解症に直接影響を及ぼさないと考えられた。

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 アレル以上有するヒト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 2677A のアレル頻度は日本人においては 12.3-21.8% と比較的高い頻度で認められるが、コーカシアンにおいては 1.9% と比較的稀な SNP である。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ー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。

#### E 結論

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。

#### 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<sup>1)2)</sup>, 山下 恵子<sup>1)</sup>, 小林 カオル<sup>1)</sup>, 細川 正清<sup>1)</sup>, 千葉 寛<sup>1)</sup> 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

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

##### 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 medroxyprogesterone 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

Furuhata 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.

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

#### 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

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

**Table 1 Genotype and allele frequency of energy metabolism related genes in case patients treated with statins for hypercholesterolemia**

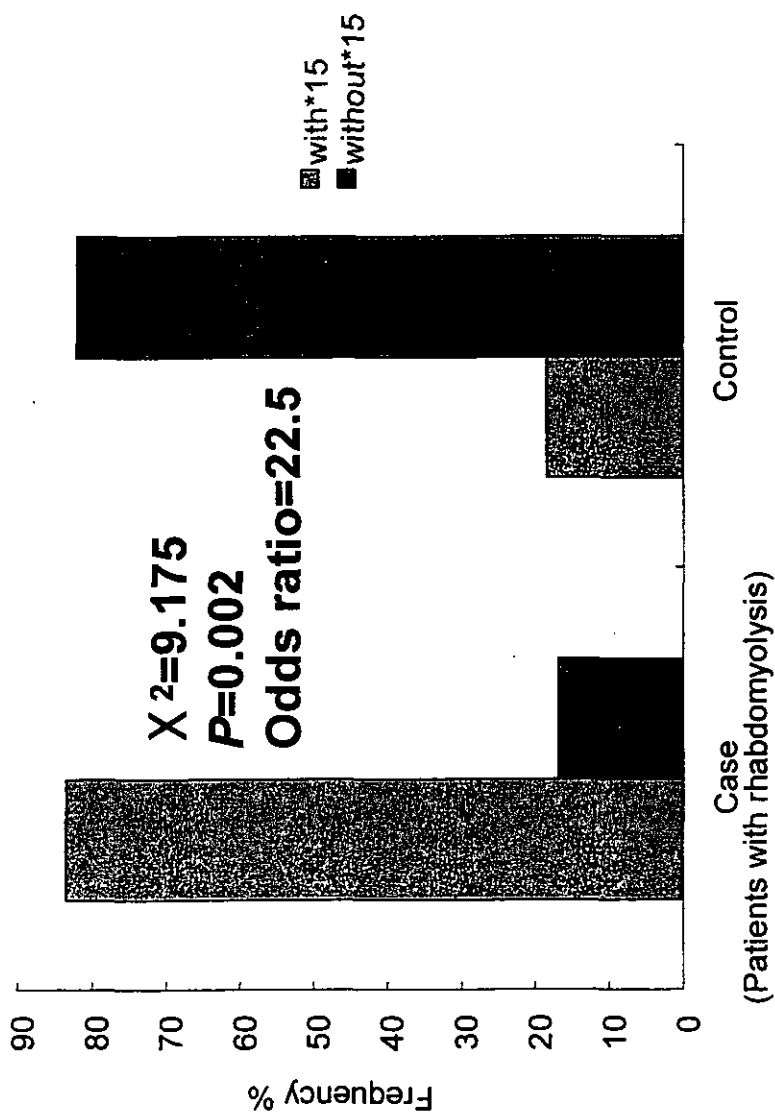
VLCAD										PYGM										LDHA									
Position	Genotype frequency (Number)			Allele frequency			Position	Genotype frequency (Number)			Allele frequency			Position	Genotype frequency (Number)			Allele frequency											
	n	w/w	w/m	m/m	n	w		m	n	w/w	w/m	m/m	n		w	m	n	w/w	w/m	m/m	n	w	m						
G128A	10	6	4	0	20	0.800	0.200	A1C/G	10	10	0	0	20	1.000	0.000	58insC	10	10	0	0	20	1.000	0.000						
C473A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	G46T/T	10	10	0	0	20	1.000	0.000	G244C	10	10	0	0	20	1.000	0.000						
A476G	10	10	0	0	20	1.000	0.000	74-87del	10	10	0	0	20	1.000	0.000	368-71delTGT	10	10	0	0	20	1.000	0.000						
G520A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	C148T	10	10	0	0	20	1.000	0.000	C511T	10	10	0	0	20	1.000	0.000						
G553A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	C159G	10	10	0	0	20	1.000	0.000	638-9delCT	10	10	0	0	20	1.000	0.000						
G637A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	C255A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	755-74del	10	10	0	0	20	1.000	0.000						
G552A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	C280T	10	10	0	0	20	1.000	0.000	G985T	10	10	0	0	20	1.000	0.000						
T728G	10	10	0	0	20	1.000	0.000	T347C	10	10	0	0	20	1.000	0.000	ND; Not determined													
A740C	10	10	0	0	20	1.000	0.000	G373T	10	10	0	0	20	1.000	0.000	CPTII													
C779T	10	10	0	0	20	1.000	0.000	C415T	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
A790G	10	10	0	0	20	1.000	0.000	C580T	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
830-832del	10	10	0	0	20	1.000	0.000	G613A	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
C842A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	G622T	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
T948C	10	10	0	0	20	1.000	0.000	C808T	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
G689A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	T875C	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
G881A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	G1045A	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
G697T	10	10	0	0	20	1.000	0.000	G1086A	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
T950C	10	10	0	0	20	1.000	0.000	1162insA+del	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
G1054A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	T1187C	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
C1096T	10	10	0	0	20	1.000	0.000	C1463A	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
G1097A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	1530delG	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
1141-43del	10	10	0	0	20	1.000	0.000	1601delA	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
G1213C	10	10	0	0	20	1.000	0.000	G1621T	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
G1246A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	A1826C	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
A1306G	10	10	0	0	20	1.000	0.000	C1726T	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
G1322A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	G1768+1A	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
G1349A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	C1804T	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
G1358A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	G1805A	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
G1350A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	G1863A	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
G1367A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	C1879A	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
C1375T	10	10	0	0	20	1.000	0.000	C1966G	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
G1388A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	A2053T	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
C1405T	10	10	0	0	20	1.000	0.000	G2056C	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
G1406A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	G2059C	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
T1505C	10	10	0	0	20	1.000	0.000	C2111T	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
C1804A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	2125-7del	10	10	0	0	20	1.000	0.000														
ND; Not determined							22604delA	10	10	0	0	20	1.000	0.000															
							C2263T	10	10	0	0	20	1.000	0.000															
							G2312A	10	10	0	0	20	1.000	0.000															
							2385-6delAA	10	10	0	0	20	1.000	0.000															
							T2392C	10	10	0	0	20	1.000	0.000															
							ND; Not determined																						

**Table 2 Genotype and allele frequency of OATP-C SNPs in case and control patients treated with pravastatin or atorvastatin for hypercholesterolemia**

Position	Rhabdomyolysis	Genotype frequency (Number)						Allele frequency			Allele frequency difference	
		n	w/w	w/m	m/m	n	w	m	$\chi^2$	P value		
A388G	+	6	0	1	5	12	0.083	0.917	1.556	0.212		
	-	22	1	9	12	44	0.250	0.750				
T521C	+	6	1	4	1	12	0.500	0.500	8.917	0.003 **		
	-	22	18	3	1	44	0.886	0.114				
C597T	+	6	0	4	2	12	0.333	0.667	2.083	0.149		
	-	22	9	7	6	44	0.568	0.432				
C1007G	+	6	5	1	0	12	0.917	0.083	0.494	0.482		
	-	22	22	0	0	44	1.000	0.000				
T217C	+	6	6	0	0	12	1.000	0.000				
T245C	+	6	6	0	0	12	1.000	0.000				
A452G	+	6	6	0	0	12	1.000	0.000				
C463A	+	6	6	0	0	12	1.000	0.000				
A467G	+	6	6	0	0	12	1.000	0.000				
T578G	+	6	6	0	0	12	1.000	0.000				
T1058C	+	6	6	0	0	12	1.000	0.000				
A1294G	+	6	6	0	0	12	1.000	0.000				
A1385G	+	6	6	0	0	12	1.000	0.000				
G1454T	+	6	6	0	0	12	1.000	0.000				
G1463C	+	6	6	0	0	12	1.000	0.000				
A1964G	+	6	6	0	0	12	1.000	0.000				
A2000G	+	6	6	0	0	12	1.000	0.000				

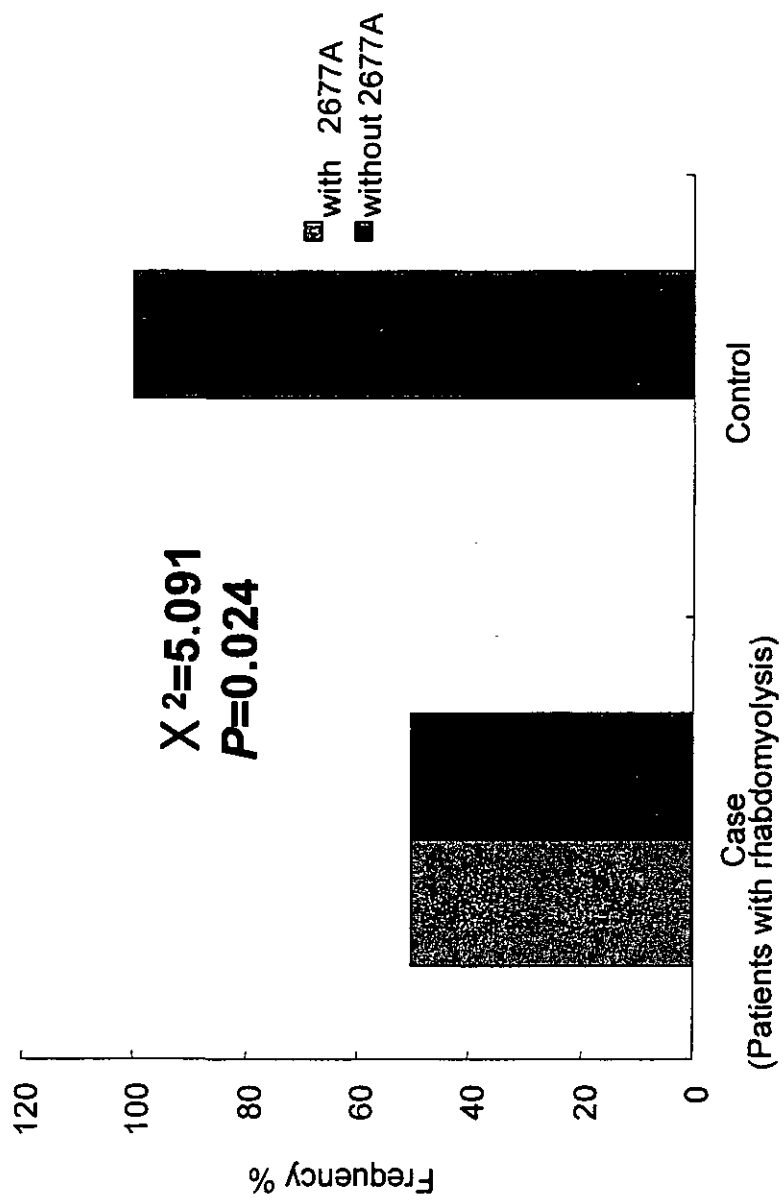


**Figure 1 OATP-C\*15-associated rhabdomyolysis in case (patients with rhabdomyolysis) and control patients treated with pravastatin or atorvastatin for hypercholesterolemia**



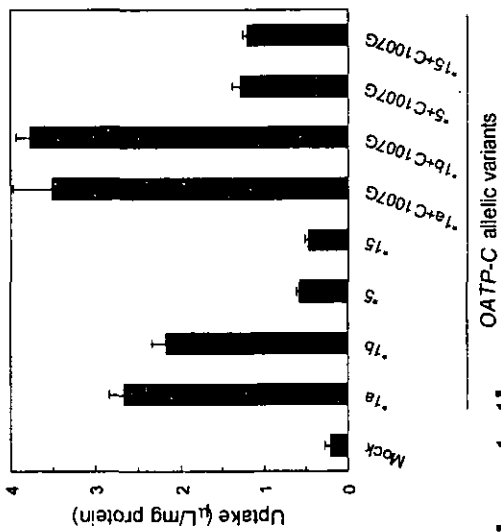
	Number	with *15	without*15	%	Probability	X <sup>2</sup>	P value	Odds ratio	95% CI
Case	5	1	83.3	16.7	9.175	0.002	22.5	(2.03 - 249)	
Control	4	18	18.2	81.8			1		

**Figure 2 MDR1 SNP (G2677A) -associated rhabdomyolysis in case (patients with rhabdomyolysis) and control patients treated with simvastatin or atorvastatin for hypercholesterolemia**

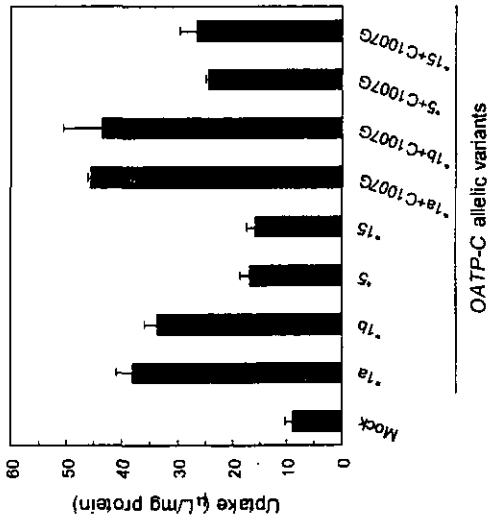


	Number	%	Probability
with 2677A	3	50.0	50.0
without 2677A	3	50.0	50.0
<b>Case</b>	<b>3</b>	<b>50.0</b>	<b>50.0</b>
with 2677A	0	0.0	0.0
without 2677A	8	100.0	100.0
<b>Control</b>	<b>8</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>

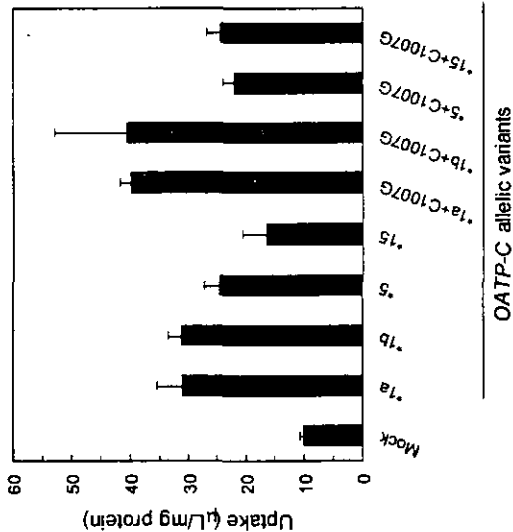
**(A) Pravastatin**



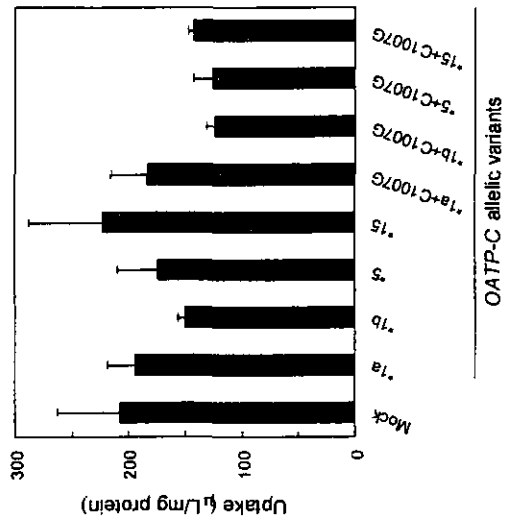
**(B) Atorvastatin**



**(C) Cerivastatin**

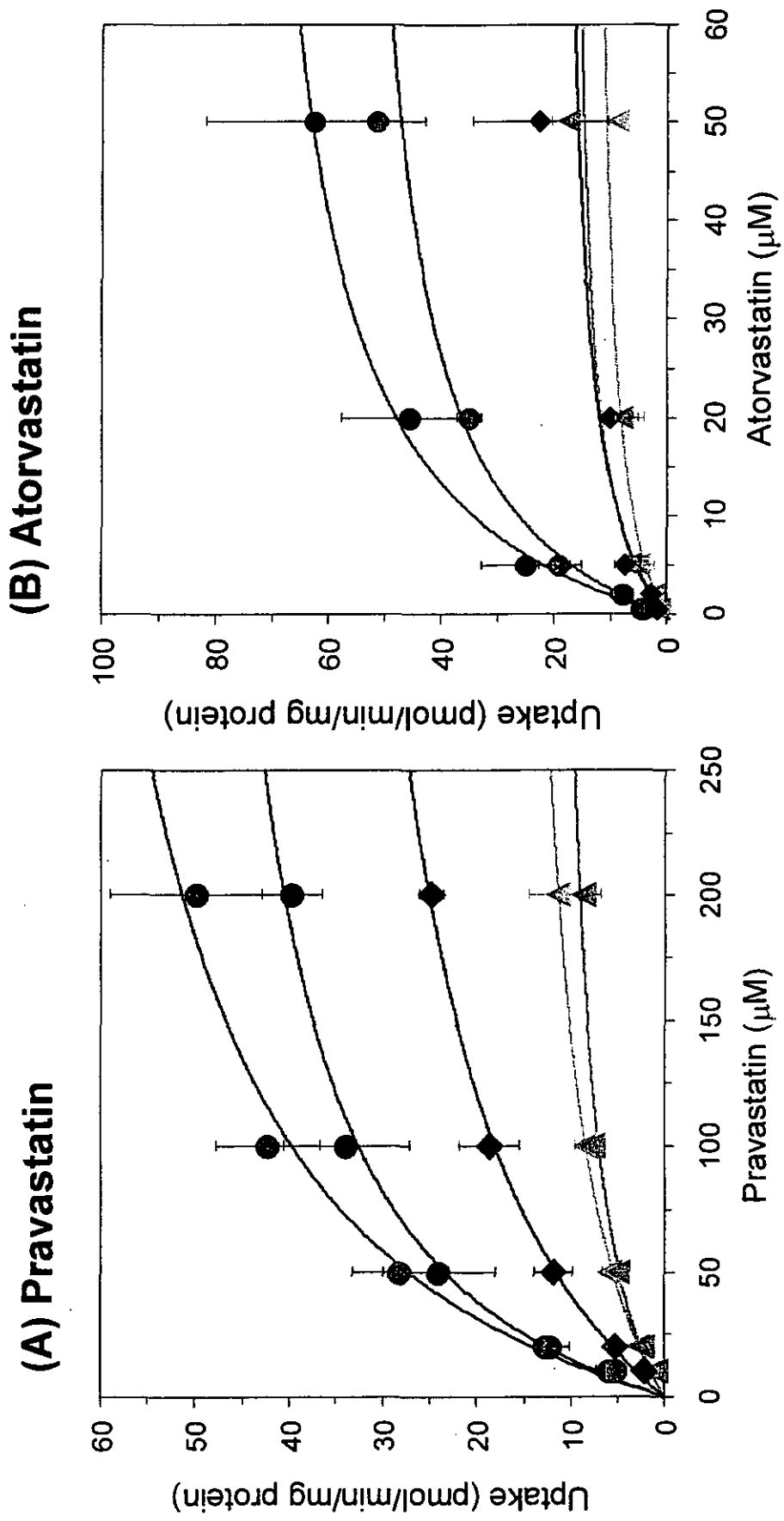


**(E) Simvastatin**



**Figure 3. The uptake of pravastatin (A), atorvastatin (B), cerivastatin(C) and simvastatin (D) by HEK293 cells transfected with OATP-C allelic variants/pCDNA3.1 or empty vector (mock). The uptake of atorvastatin (0.5 mM), cerivastatin (0.5 mM) and simvastatin (10 mM) were measured for 1 min, and the uptake of pravastatin (20 mM) was measured for 5 min, respectively. Each bar represents mean  $\pm$  S.D. of triplicated determinations.**

**Figure 4. Kinetic analysis of pravastatin and atorvastatin uptake by *OATP-C* allelic variants**



厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・再生医療研究事業）

分担研究報告書

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

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特に HMG CoA 還元酵素阻害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 HMG CoA 還元酵素阻害剤誘起性横紋筋融解症患者検体の収集」に着手した。収集方法にかんしては主として千葉県下の主要病院を中心とした横紋筋融解症患者DNA試料採取ネットワークの確立し症例の収集を行い、さらに製薬会社の安全性情報部と協力し全国的な症例収集を試みた。

キーワード：薬剤誘起性横紋筋融解症、HMG CoA 還元酵素阻害剤、高コレステロール血症、薬物有害反応原因遺伝子、SNP 探索

#### 研究協力者

千葉大学大学院薬学研究院医薬品情報学  
助教授 佐藤信範

#### 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。この有害作用に一部の患者は鋭敏に反応し、予想できない有害事象を示し、死にいたることもある。これらの状況を考えると、現代医療において有害な副作用を防止するための有効な対策を打ち立てることは緊急課題といえる。

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を確立することである。具体的な目

標として、薬剤誘起性横紋筋融解症特に HMG CoA 還元酵素阻害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。本研究の遂行により、有害な副作用の発生を未然に回避できるようになれば、国民の保健・医療と福祉の向上に多大に貢献する。

#### B. 研究方法

対象患者：高コレステロール血症の診断のもと HMG CoA 還元酵素阻害剤薬を内服中に薬剤誘起性横紋筋融解症と診断されたもの。対照は：高コレステロール血症の診断のもと HMG CoA 還元酵素阻害剤薬を内服中にも横紋筋融解症を認めないもの。

試料等の種類、量：末梢静脈血 10 cc より DNA を抽出し、これを解析に用いる。

解析は厚生科学研究（ヒトゲノム・再生医

療研究事業)「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」研究の主任研究者であり、その分担研究「薬剤誘起性横紋筋融解症原因遺伝子と SNP 及び薬物代謝酵素関連 SNP の探索と機能解析」を行う千葉寛氏が行う。

対象症例は千葉大学医学部附属病院を中心とした、千葉県下の病院より収集した。

HMG CoA 還元酵素阻害剤誘起性横紋筋融解症の発症頻度が低いため、症例数が少ない結果であり、かつ水溶性 HMG CoA 還元酵素阻害剤による薬剤誘起性横紋筋融解症の原因遺伝子が解明されつつあることより、水溶性 HMG CoA 還元酵素阻害剤の製造・販売元である製薬会社に協力を依頼し同社に収集されている水溶性 HMG CoA 還元酵素阻害剤誘起性横紋筋融解症症例の開示の可能性を検討した。

(倫理面への配慮)

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生命倫理委員会と提供者の同意を得て行う。本研究で得られた個人情報、外部にもれることのないよう厳重に管理する。試料等は個人識別情報管理者を設け、連結可能匿名化することにより、研究者に患者の同定ができないように配慮する。また研究成果の発表にあたっては患者の氏名などは一切公表されないこととする。

### C. 研究結果

まず、対象患者の同定のために、本研究の HMG CoA 還元酵素阻害剤誘起性横紋筋融解症の診断基準を作成した(昨年度報告書 参考資料 1, 2)。続いて HMG CoA 還元酵素阻害剤誘起性横紋筋融解症患者および対

象者(当初は千葉大学医学部附属病院およびその他の千葉県下の病院にて治療を受けている患者を対象)より検体採取を行うため、本研究の意義と目的を説明し、インフォームドコンセントに基づいた同意書を頂き、血液を提供していただいた。そのため、千葉大学大学院医学研究院および同薬学研究院双方において生命倫理審査委員会に各種書類(昨年度報告書 3, 4, 5, 6)を提出し審査の結果、研究の許可をいただいた。対象患者が同定された千葉大学医学部附属病院以外の千葉県下の病院においても生命倫理委員会に書類を提出し、研究の許可をいただいた。生命倫理委員会のない病院・医院において対象患者が同定された場合には、患者さんに理解いただき千葉大学医学部附属病院を受診いただき、同意の上検体の採取を行った。協力を依頼した病院・医院のうち、対象患者が同定され検体採取まで至った施設および担当医師は

千葉大学医学部附属病院

第二内科 斉藤 康教授、武城英明教授

第一内科 上田志朗医師

千葉社会保険病院 家里憲二副院長

県立東金病院 平井愛山院長

日向台クリニック 菅沢寛院長

である。

また製薬会社に収集されている水溶性 HMG CoA 還元酵素阻害剤誘起性横紋筋融解症症例の開示を担当医師および当該患者に依頼するため研究主旨説明文(担当医師用:参考資料 1, 2)および患者様用の「研究へのご協力をお願い」(昨年度報告書 参考資料 5.)「同意書」(昨年度報告書 参考資料 6.)を用意した。これにより複数の医師・患者様より協力が得られた。

#### D. 結論

約30名のHMG CoA還元酵素阻害剤誘起性横紋筋融解症患者様および約30名の高コレステロール血症の診断のもとHMG CoA還元酵素阻害剤薬を内服中にも横紋筋融解症を認めない患者様よりの検体の収集に成功し、分担研究「薬剤誘起性横紋筋融解症原因遺伝子とSNP及び薬物代謝酵素関連SNPの探索と機能解析」を行う千葉寛氏に提供した。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) 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 Infomatics Vol.4 4:151-157, 2003
- (2) 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
- (3) 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  $\gamma$  R III in the induction of accelerated nephrotoxic glomerulonephritis. Kid Intern, Vol.64, 1406-1426, 2003
- (4) 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)

(5) 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

#### 2. 書籍

(1) 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

#### 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 |

以下に参考資料を添付する

参考資料1.

研究主旨説明 (医師用)

参考資料2.

候補遺伝子 (医師用)

## 参考資料1

### 研究主旨説明

千葉大学大学院薬学研究院

医薬品情報学 教授 上田志朗(医師)

薬物学 教授 千葉 寛

#### 1. HMG-CoA 還元酵素阻害剤による横紋筋融解症について

高脂血症治療薬であるHMG-CoA還元酵素阻害薬(スタチン)は、先生ご存知のように、まれに横紋筋融解症を起こすことが知られています。臨床試験でスタチン服用により報告されたミオパチーの頻度は0.1%-0.2%とされています。しかし実際には併用薬や合併症等多様な患者背景の存在する臨床現場ではCKのモニター等により未然に横紋筋融解症の発症を回避した例も含めると発症頻度は報告されているより高い可能性が考えられます。発症の原因は不明ですが、いくつかの仮説が提唱されています。一つは、骨格筋細胞膜のコレステロール含量低下による不安定化、もう一つは、ユビキノンやイソプレノイドの減少です。

#### 2. 研究概要

本研究は、スタチンによる横紋筋融解症と候補遺伝子における遺伝子多型の関連性を明らかにすることを目的として行っております。候補遺伝子として、薬物動態関連遺伝子からOATP-C, MDR1, MRP2, CYP3A4を、先天性横紋筋融解症の原因遺伝子からVLCAD, CPTII, PYGM, LDHAを選択(別紙参照)し、総計152箇所の既知変異について解析を進めております。

##### 進捗状況

スタチン内服により3x ULN以上のCK上昇または重篤な筋肉症状が認められた患者10例を収集し、スタチンを1年以上服用しても筋肉症状およびCKの上昇が認められない患者26例を対照として関連性研究を行いました。その結果、先天性横紋筋融解症の原因遺伝子、MRP2, CYP3A4の多型に症例-対照間で頻度の差は認められませんでした。プラバスタチンまたはアトルバスタチン服用患者において(case, n=6; control, n=22)OATP-C\*15の頻度が症例群で有意に高い(P=0.01)ことが分かりました。また、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も(case, n=6; control, n=8)MDR1の2677A頻度が症例群で高い傾向が認められ、横紋筋融解症に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられました。以上の結果から、OATP-C\*15はプラ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発症の危険因子の一つである可能性が考えられます。以上の結果は薬学領域の学会にて発表させていただいております。2003年札幌で開催されました日本薬物動態学会年会にて「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」として発表しました。この際、ベストポスター賞をいただいております。

#### 2-2. 課題

少数例でのcase-control studyは確実性に乏しいため、多数の症例を収集し今回得られた結果を確認する必要があります。また、横紋筋融解症発症との関連性はあっても遺伝子頻度の低いアレルでは関連性が検出されなかった可能性が考えられます。そこで今回、研究規模を拡大し、データの確実性の確保と関連性の検出感度の向上を図る目的で症例収集へのご協力をお願い



申し上げる次第です。

### 3. 期待できる結果

スタチンによる横紋筋融解症に高感受性を示す可能性のあるヒトを予め予測することが可能になると考えております。ある意味でオーダーメイド医療のさきがけ的臨床研究になるのではないかと期待しているところです。

先生と先生の患者さんにご理解いただけましたなら、上田志朗が詳細な説明にあがりますのでよろしくおねがいします。倫理委員会等の必要書類が必要でしたなら、文章作成等できるだけのを協力させていただきます。

## 参考資料2

(参考)候補遺伝子について

### 1. エネルギー産生系遺伝子

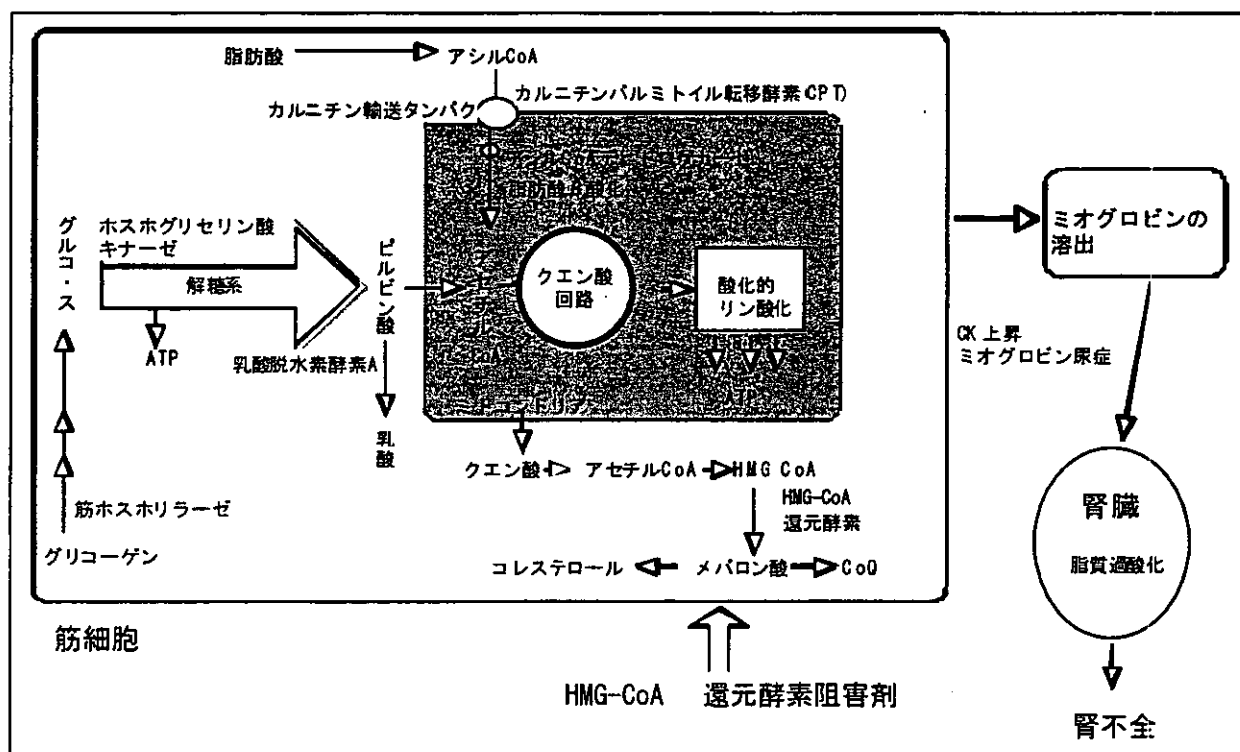
#### 1-1. 選択根拠

スタチン投与により血中の CoQ レベルが低下することが報告されています。スタチンによるミオパチーにおいてもミトコンドリアミオパチーに類似した症状が報告されています。これらのことから、スタチンが骨格筋におけるエネルギー産生に何らかの作用を及ぼしている可能性が考えられます。従って筋細胞内のエネルギー産生の低下を伴う要因を有する患者ではスタチンによる横紋筋融解症に対する感受性が高い可能性が考えられます。

#### 1-2. 候補遺伝子

日常生活にはなんら支障を及ぼさないが、激しい運動やウイルス感染等の負荷により横紋筋融解症が発症することが知られている先天性横紋筋融解症の原因遺伝子から候補遺伝子を選択しました。

- *Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)* (脂肪酸β酸化)
- *Carnitine palmitoyltransferase II (CPTII)* (脂質のミトコンドリアへの輸送)
- *Myophosphorypase (PYGM)* (糖質代謝)
- *Lactate dehydrogenase-A (LDHA)* (糖質代謝)



## 2. 薬物動態関連遺伝子

### 2-1. 選択根拠

スタチンによる横紋筋融解症には用量依存性があります。またスタチンの代謝、排泄を阻害する薬物との併用による横紋筋融解症が多く報告されています。従ってスタチンの血中濃度の上昇は横紋筋融解症の発症の危険率を増大する要因の一つと考えられます。スタチンの体内動態に重要な役割を果たすと考えられる遺伝子を候補遺伝子として選択しました。

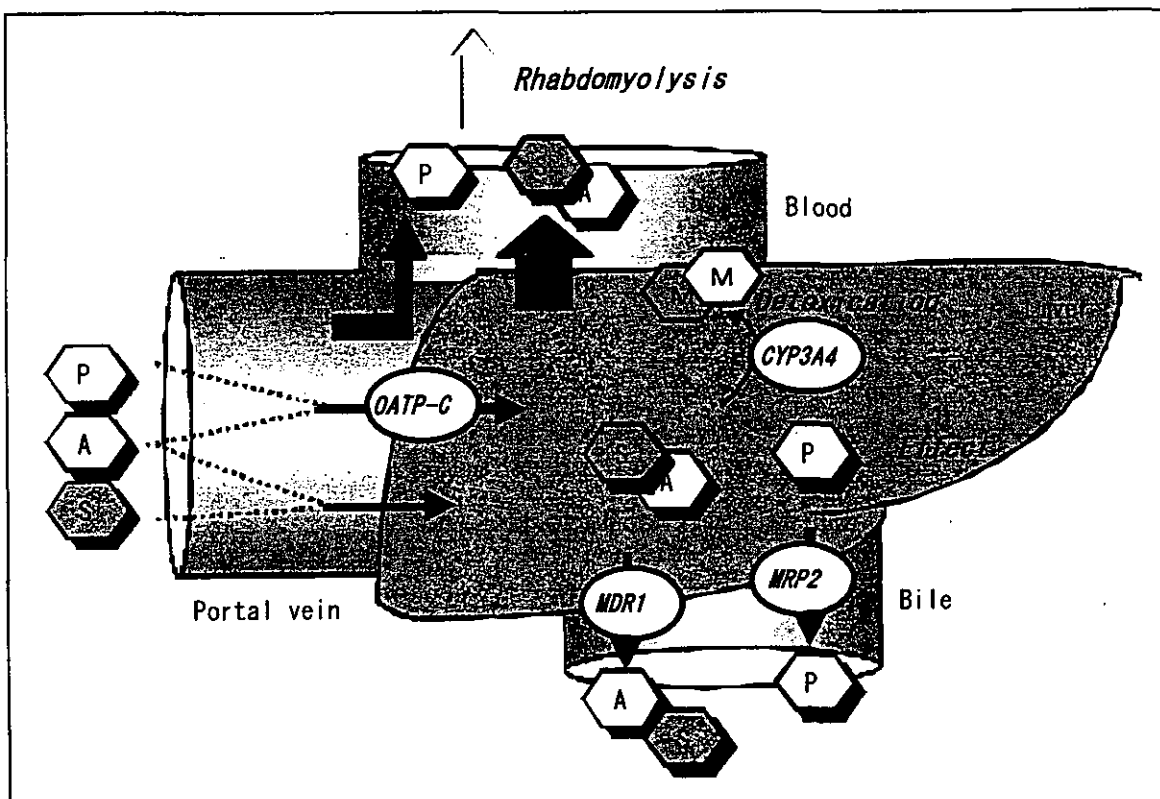
### 2-2. 候補遺伝子

・ Organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C) (基質: プラバスタチン、アトルバスタチン)  
OATP-C は肝臓特異的な有機アニオントランスポーターであり、タウロコール酸等の有機アニオンを基質として血液から肝細胞内へ輸送する。OATP-C の多型によりプラバスタチンの血中濃度に大きな差が生じる。

・ Multidrug resistance protein 1 (MDR1) (基質: シンバスタチン、アトルバスタチン)  
MDR1 は構造の異なる多くの薬物を ATP 依存的に細胞外に排出する ABC トランスポーターで、小腸、結腸、肝胆管側膜、腎臓、血液脳関門等に発現している。MDR1 の機能低下は脂溶性スタチンの血中濃度を上昇させると考えられる。

・ Multidrug resistance protein 2 (MRP2) (基質: プラバスタチン)  
MRP2 は肝細胞胆管側膜、小腸、尿細管、血液脳関門、胎盤に発現している ABC トランスポーターで、様々な内因性、外因性物質を ATP 依存的に細胞外に排出する。MRP2 欠損ラット (Eisai hyperbiliruminemic rats, EHBR) においてプラバスタチンの血中濃度が野生型に比較して高いことが報告されている。さらに EHBR では低用量のプラバスタチンで横紋筋融解症を発症する。

・ CYP3A4 (基質: シンバスタチン、アトルバスタチン)  
アトルバスタチンは主に CYP3A4 により代謝される。CYP3A4 の強力な阻害剤である HIV プロテアーゼ阻害剤、エリスロマイシン、アゾール系抗真菌薬はアトルバスタチン、シンバスタチンの血中濃度を上昇させる。またシンバスタチンおよびアトルバスタチンと CYP3A4 を阻害する薬物の併用により横紋筋融解症の頻度が上昇することが知られている。



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 田中 敏博

理化学研究所遺伝子多型研究センター チームリーダー

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でアミノ酸置換を伴う27SNPについて患者サンプルを用いて解析を行った。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、6つの原因遺伝子が単離されたが、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, KCNE1, KCNE2), 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

SNPタイピング

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。

(倫理面への配慮) 共同研究機関および理化学研究所倫理審査委員会にて、本研究計画は承認されている。

C. 研究結果および考察

タイピングの結果は別表の通り。全体としてみると、アレル頻度の比較において有意差を示すSNPは存在しなかった。不整脈を惹起した原因薬剤別にみると、ピルメノールが原因の場合に、KCNK6 内のSNPにおいて有意差を示した。ただし、サンプル数は5と絶対的に少なく、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たなければならない。

D. 結論

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。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  
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  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし