

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

副作用発現回避を目的とした代謝物発現プロファイル  
及び薬剤反応性遺伝子の解析

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 平塚 真弘

平成16（2004）年4月

目 次

I	総括研究報告 副作用発現回避を目的とした代謝物発現プロファイル及び 薬剤反応性遺伝子の解析	1
II	研究成果の刊行に関する一覧表	6

副作用発現回避を目的とした代謝物発現プロファイル及び薬剤反応性遺伝子の解析

主任研究者 平塚 真弘 東北薬科大学講師

研究要旨

本研究は、薬剤反応性遺伝子の一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)が代謝物発現プロファイルや副作用発現にどのように影響するかを解析し、トキシコケノミクス及びトキシコメタホロミクスの情報をより効果的かつ安全な薬物療法に利用するために立案した。特に本研究では多くの薬物の代謝に関与していると考えられている薬物代謝酵素 CYP3A4 の基質薬物である抗血小板薬シロスタノールの代謝物プロファイルの個人差とその代謝に関与する薬剤反応性遺伝子(CYP3A4、CYP3A5、CYP2B6、PXR、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$ 、HNF1、HNF4)の既知 SNP 251箇所について相関解析を行った。その結果、OPC-13015/シロスタノール血中濃度比は CYP3A4 の発現調節に関与していると考えられる RXR 遺伝子と HNF4 遺伝子の一部の SNP の関連性が認められた。それに対し、OPC-13213/シロスタノール血中濃度比は CYP2B6 の一部の遺伝子型(CYP2B6\*5 及び CYP2B6\*6)と高い相関が認められた。これらの結果は、シロスタノールが肝において、主に CYP3A4 により OPC-13015 へ、CYP2B6 により OPC-13213 へと代謝されることに対応していると考えられた。今回の結果より、CYP3A4 関与の薬物代謝予測が CYP3A4 遺伝子そのものの解析だけでなく、その発現調節を行っている RXR 遺伝子等の発現量や構造変化の解析により可能になることが期待できた。

A 研究目的

ある種の薬物を服用すると、副作用が発現しやすい人たちが存在する。この要因として、肝や小腸の薬物代謝酵素であるチトクロームP450(CYP)やCYP以外の代謝酵素が遺伝的に機能低下していることが最近報告されている。また、副作用発現の感受性に関しても、いくつかの遺伝的背景が原因となることもある。したがって、ファルマコケノミクスやトキシコケノミクス研究は、厚生労働省が推進する医薬品の適正使用という点で、重篤な副作用発現回避やQOLの低下防止に貢献することが期待されている。しかし、これまでに薬剤反応性遺伝子のSNPがトキシコメタホロミクスの側面で、どのような影響を及ぼしているかを詳細に解析した例はほとんど存在しない。特に広範な薬物の代謝酵素として知られるCYP3A4の機能や発現量に影響するSNPに関しては、統一した見解が得ら

れていないのが現状である。仮に遺伝子診断や代謝物発現プロファイルの情報が副作用発現予測に応用できるなら、より安全かつ効果的な薬物療法が行われ、国民医療に貢献できると考えられる。本研究では、前年度にCYP3A4の基質薬物である抗血小板薬シロスタノールをモデル薬物として、その代謝物プロファイルの個人差を明らかにしたのを受けて、本年度はそれらの代謝に関与すると考えられる薬剤反応性遺伝子のSNP解析を行う。このことにより、CYP3A4で代謝される薬物の体内動態かどのような因子により影響を受けるかが明らかとなり、薬剤効果や副作用発現の予測を支援できると考えられる。

B 研究方法

シロスタノール 100mg を 1 日 2 回、1 週間以上服用し、薬物血中濃度が定常状態となっている患者の

末梢血を採取した。常法に従いゲノム DNA を抽出し、SNP 解析用の試料とした。解析対象遺伝子はシロスタノール代謝に関与すると考えられる薬物代謝酵素 CYP3A4、CYP3A5、CYP2B6、肝特異的発現調節因子 HNF1、HNF4A、CYP3A4 の発現調節因子 PXR、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$  遺伝子の 251 箇所の SNP とした。また解析後、完全に連鎖不平衡にある SNP をグループ化し1つにまとめた。SNP 検出法は Invader 法、PCR-RFLP 法あるいは TaqMan 法のいずれかを用いた。得られた SNP 情報は個人のシロスタノール濃度、主要代謝物 OPC-13015 濃度、主要代謝物 OPC-13213 濃度、代謝比 OPC-13015/シロスタノール濃度比及び OPC-13213/シロスタノール濃度比との間で、単変量及びタミー変数を用いた分散分析と Kruskal-Wallis 検定による統計学的解析を行った。また、平成 14 年度に得られた体内薬物濃度の個人差をさらに詳細に解析した。

(倫理面への配慮)

今回の研究プロトコールは本邦における「ヒトゲノム 遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、東北薬科大学 大学院倫理委員会及び東北大学医学部倫理委員会に申請 承認された同名課題「薬剤反応性遺伝子の多型性が薬効及び薬物動態に与える影響に関する研究」に従って実施された(承認済)。

(サンプルの入手と取り扱い)

今回使用するサンプルは、東北大学医学部附属病院受診の患者に対し、研究内容の十分な説明と書面による同意(インフォームドコンセント)が得られたものを用いた。説明と同意は東北大学医学部附属病院における研究協力者の医師(佐藤成、秋元弘治)又は薬剤師(菱沼隆則、岸川幸生)によって行われた。これらのサンプル採取に際しては、強制的な圧力がかからぬように十分留意し、完全な自由意志のもとで行われた。また、研究対象者に対する人権擁護上の配慮をするにあたり、すべてのサンプルは連結可能匿名化を行った後、取り扱うこととし、一切の個人情報か漏洩されないようにした。よって、研究対象者に

対する不利益は生じにくいと考えられた。ただし、細心の注意を払い、研究対象者の不利益につながる行為等を回避することを前提とした。

(危険性の排除や説明と理解に関わる状況)

サンプル採取に際して、その対象が末梢血である場合は採血操作の熟練した医師、看護師あるいは臨床検査技師に依頼し、それに関わる事故発生の可能性を最小限にした。研究計画の説明は医師、薬剤師あるいは研究協力者が行い、患者かその旨を完全に理解し同意した後にはじめて実施されることを確認した。

### C 研究結果

平成 14 年度に得られた体内薬物濃度の個人差をさらに詳細に解析した。各個人のシロスタノール、OPC-13015 及び OPC-13213 血中薬物濃度に関して、シロスタノール濃度と OPC-13015 濃度には中程度の相関性( $r=0.75$ )か、シロスタノール濃度と OPC-13213 濃度には低い相関性( $r=0.61$ )が認められた(図 1)。

次に酵素活性の指標となる代謝比(OPC-13015/シロスタノール(MR13015)、OPC-13213/シロスタノール(MR13213))の個人差を解析した結果、MR13015は単峰性に、MR13213は三峰性を示すことが明らかになった(図 2)。次に、34 人のシロスタノール投与患者において、シロスタノール濃度、OPC-13015 濃度、OPC-13213 濃度、OPC-13015/シロスタノール比及び OPC-13213/シロスタノール比と各薬剤反応性遺伝子 SNP の遺伝子型の相関解析をした結果、個人の MR13015 に影響を及ぼす因子としては RXR $\alpha$ 、RXR $\gamma$  及び HNF4 遺伝子の SNP が見いだされ、それぞれの遺伝子型に有意な相関性が得られた(図 3)。MR13213 と CYP2B6 の SNP の関係に関しては、ハプロタイプ解析を行った。すなわち、検出された SNP により対立遺伝子型を特定し、その遺伝子型と代謝比との相関性を解析した。その結果、遺伝子型の種類が多く、ほとんどの遺伝子型で  $N=1$

という分布であったため、単変量の分散分析では有意でなかった。しかし最近、*in vitro* の試験から CYP2B6\*2-\*7 由来の酵素タンパクは代謝活性が野生型(CYP2B6\*1)よりも高いという報告が相次いでなされており、特に CYP2B6\*6 アレルはシクロフォスファミトの代謝能が亢進していることが明らかになっている。そこで、CYP2B6\*5 と\*6 アレルを変異アレルと仮定し、どちらかのアレルを1つ有している場合を、ヘテロ型(H)、2つ有している場合を変異ホモ型(M)、全く有していない場合を野生型(W)と分類し、分散分析を行った。その結果、CYP2B6 の遺伝子型により代謝比に有意差が認められた(図4)。

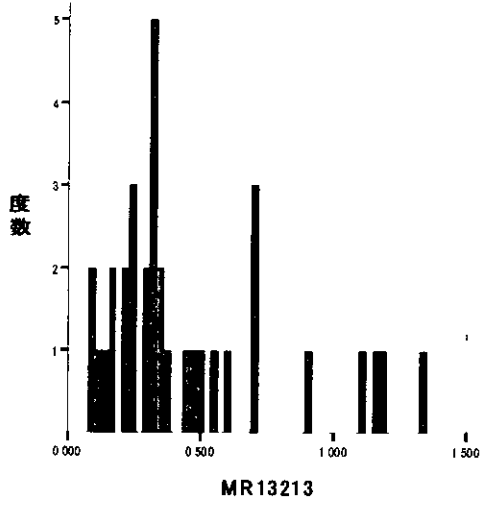
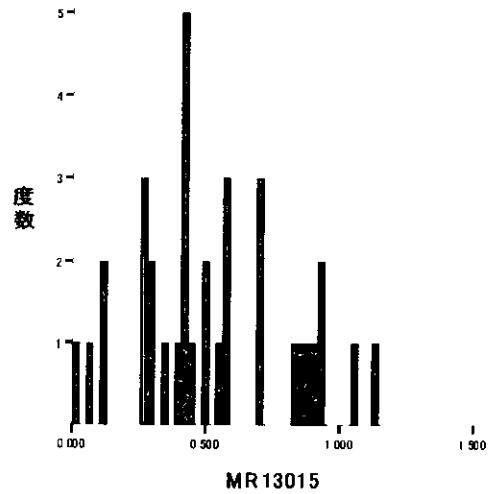


図2 代謝比のヒストグラム

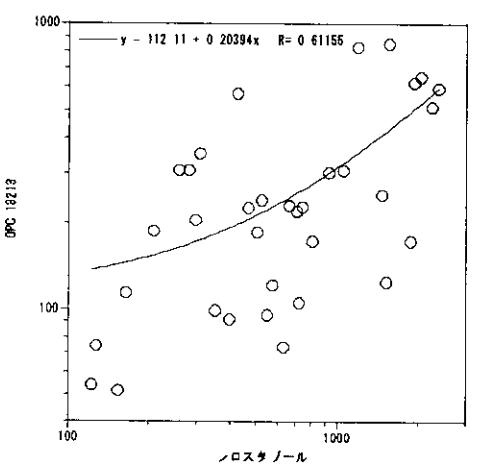
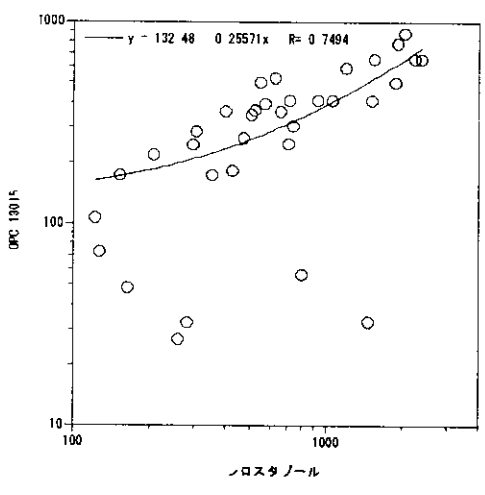


図1 血清シロスタノール濃度と代謝物濃度の回帰分析

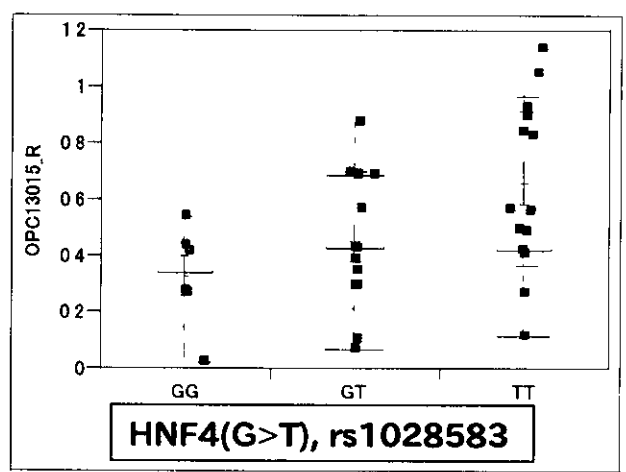


図3 MR13015に影響を及ぼすSNPとその遺伝子型

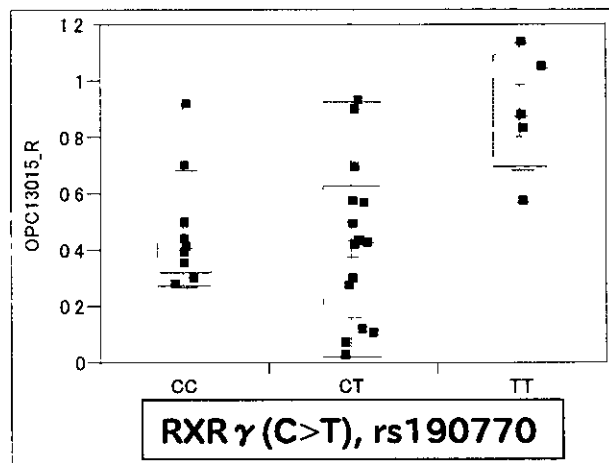
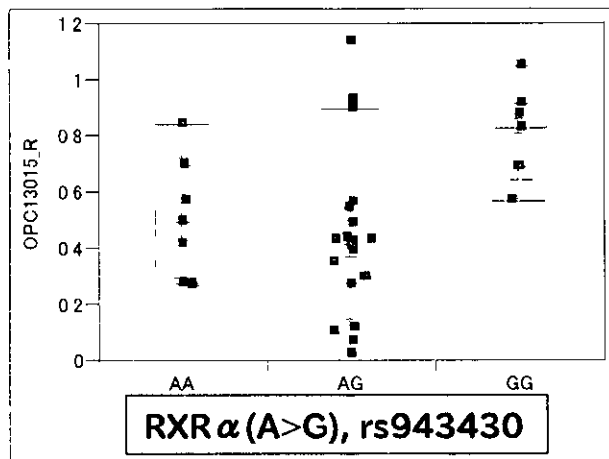
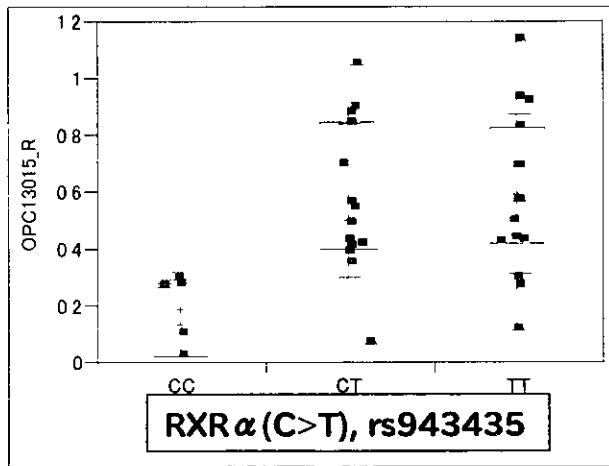


図3 MR13015に影響を及ぼすSNPとその遺伝子型

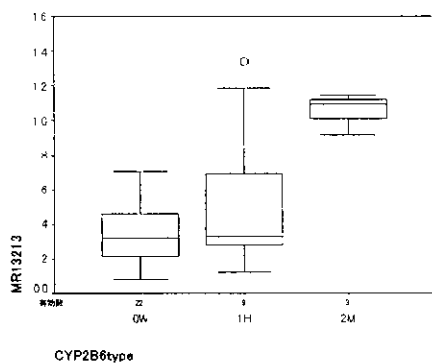


図4 MR13213に影響を及ぼすCYP2B6の遺伝子型 (CYP2B6\*5とCYP2B6\*6を変異アレルとした場合)

## D 考察

これまでに抗血小板薬シロスタノールの代謝に関するトキシコケノミクス研究はほとんど行われてこなかった。今回、シロスタノール投与患者の薬物動態および副作用発現とそれに関与する薬剤反応性遺伝子のSNP解析を行った。以下に今回得られた結果から考察してきたことをまとめた。

- ① シロスタノール代謝物、OPC-13015 および OPC-13213 の定常状態におけるトラフ濃度は、各個人で親化合物の濃度に強い相関性があることが判明した。この結果より、シロスタノールの薬物動態は、代謝(CYP等)だけでなく分布(薬物トランスポーター等)の影響を大きく受けることが示唆された。
- ② 主要代謝物/親化合物比の個人差をヒストグラムで表したとき、OPC-13015/シロスタノール比は一峰性を、OPC-13213/シロスタノール比は三峰性を示した。この結果は、OPC-13015 への代謝は主に CYP3A4(酵素活性に影響する SNP はほとんど報告されていない)で、OPC-13213 への代謝は主に CYP2B6(酵素活性が上昇する SNP あり)が触媒していることを支持するものであった。
- ③ 個人の OPC-13015/シロスタノール比に影響を及ぼす SNP は RXR がほとんどであり、主要代謝酵素である CYP3A4 の発現調節段階での調節機構の存在が示唆された。つまり、RXR や NHR4 遺伝子の SNP により、それらのタンパク構造や発現量が変化し、それに伴い CYP3A4 の発現量が変化することが予想された。
- ④ 個人の OPC-13213/シロスタノール比に強く影響を及ぼす SNP は CYP2B6 であり、特に CYP2B6\*5 と\*6 アレルの酵素活性上昇機構が影響することが示唆された。

## E 結論

今回シロスタノール投与患者の薬物動態とそれに

関与する薬剤反応性遺伝子のSNP解析を行った、シロスタノールは現在臨床現場で使用されている多くの薬物と同様に薬物代謝酵素CYP3A4によって代謝される。つまりシロスタノール代謝の個人差の原因を解明すること、あるいは薬物動態予測につながる因子を見出すことで広範な薬物の体内動態予測を可能にすることが期待される。これまでCYP3A4が関与する薬物代謝の予測は非常に困難であった。その原因としては、CYP3A4は他のCYPと異なりコーディング領域にほとんどSNPが存在しないため、その酵素自身の活性低下ではなく、タンパク発現量が体内薬物動態を左右し、個人差を生み出していると考えられるからである。しかし、今回の大量SNP解析の結果、CYP3A4の発現量を予測する因子としてRXR遺伝子の一部のSNPが見いだされた。これらのSNPはRXRのイントロンSNPであったため、これらのSNPあるいはこのSNPとリンクしているSNPやハプロタイプの存在により、RXRタンパクの発現量が変化することでCYP3A4タンパクの発現量が変化する可能性が考えられる。また、副産物的ではあるが、CYP2B6活性の指標として用いたOPC-13213/シロスタノール比がCYP2B6遺伝子型により強く影響を受けることが判明した。この結果は、シロスタノールがin vivoにおけるCYP2B6活性の有用なプローブトラッグになり得ることを意味する貴重なデータである。今後、今回得られたデータに加えて、さらに詳細なRXR遺伝子のSNP及びハプロタ

イプ解析を行うことで、CYP3A4代謝に関与する広範な薬物の動態予測が可能になることが期待される。

## F 健康危険情報

特になし

## G 研究発表

### 1 論文発表

Three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *CYP2B6* gene in Japanese individuals  
Masahiro Hiratsuka, Yudai Hinai, Yumiko Konno, Hisayoshi Nozawa, Shoetsu Konno, Michinao Mizugaki Drug Metabol Pharmacokin, in press

### 2 学会発表

抗血小板薬シロスタノールの代謝に関与する薬剤反応性遺伝子のSNP解析

平塚真弘、岸川幸生、奈良原香織、後藤順一、佐藤成、秋元弘治、白土敬之、関豊和、水柿道直、日本薬学会第124年会、大阪市、2004年3月

## H 知的財産権の出願 登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧

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
Masahiro Hiratsuka, Yudai Hinaï, Yumiko Konno, Hisayoshi Nozawa, Shoetsu Konno, Michinao Mizugaki	Three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the <i>CYP2B6</i> gene in Japanese individuals	Drug Metabol Pharmacokin			in press