

別添2

厚生労働科学研究費補助金

医薬品等医療技術リスク評価研究事業

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

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	1
千葉 寛	

II. 分担研究報告

1. CYP2C9の遺伝子多型と人種差	7
越前 宏俊	
2. トランスポーターの遺伝子多型と人種差	9
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	35
千葉 寛	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	41
-----------------------	----

別添4

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 CYP3A4、UGT1A1、CYP2C9 及び輸送担体である 8 種のトランスポーターについて解析を行った。その結果、CYP3A4 遺伝子については、CYP3A4*2、CYP3A4*5 の発現頻度の人種差を見いだすことはできなかったが、CYP3A4*6 に関しては日本人にだけヘテロ接合体を見いだすことができた。OATP-C については、OATP-C*5 と OATP-C*15 のを HEK293 細胞に導入発現させプラバスタチンの輸送活性を比較したところ、OATP-C*5、OATP-C*15 のいずれについても野生型の 1/6 以下の大きな低下を示すことが明らかとなり、OATP-C*5 と OATP-C*15 を足した頻度の人種差から、これらの変異に起因する OATP-C の機能低下者の頻度は日本人で最も高く、OATP-C の平均的な機能も日本人では低い可能性が示された。UGT1A1 については*6、*27、*28 の頻度の人種差に関する検討を行った結果、GT1A1*28 のについては、どの人種も 6 回及び 7 回の繰り返し型が主であったが、野生型の頻度は日本人で最も高く黒人種で最も低く、多様性に富むことを明らかにした。また、UGT1A1*6 においても変異型の発現頻度に著しい人種差の存在が見いだされたことから、UGT1A1 が代謝に関与する新薬の承認審査にあたっては、これらの変異遺伝子の発現頻度の人種間差を十分考慮に入れる必要があるものと考えられた。次に、トランスポーターについては、8 種類のトランスポーター：BCRP (breast cancer resistance protein), OATP-B (organic anion transporting polypeptide-C), OATP8, MDR1 (multi-drug resistance 1), OCT1 (organic anion transporter 1), OCT2, OCT3, MRP4 (multidrug resistance associated protein 4) を対象とした遺伝子解析を行った。その結果、これらの遺伝子の変異は日本人で高い傾向にあり、人種間の比較では、日本人と黒人における頻度は同程度であるケースが多いものの、白人とでは大きな差が見られることを明らかにした。CYP2C9 については、黒人種を中心に CYP2C9*2、*3、*4、*5、*6、*11 の変異解析を行った。その結果、150 人中 CYP2C9*3 アレル保有者 3 名、CYP2C9*5 と *6 保有者をそれぞれ 1 名、*11 保有者を 11 名検出した。上流域に関しても検討を行いその結果から上流領域の変異については黒人の場合、白人およびアジア人とは一部異なるパターンを示すことを明らかにした。

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

家入一郎

鳥取大学医学部附属病院薬剤部助教授

越前宏俊

明治薬科大学教授

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状态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

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) CYP3A4 と OATP-C

今年度は機能低下に関わるとされるCYP3A4遺伝子の変異(CYP3A4*2, CYP3A4*4, CYP3A4*5, CYP3A4*6, CYP3A4*8)について、比較を行った。また、昨年度分担研究者である家入が頻度に人種差が存在することを明らかにした、OATP-C*5とOATP-C*15について機能への影響を*in vitro*で検討した。

その結果、CYP3A4遺伝子の変異については、CYP3A4*2, CYP3A4*5の場合、解析した全ての人種において変異を見いだすことはできず、発現頻度に人種差は見られなかった。一方、CYP3A4*6に関しては、白人種(150人)と黒人種(150人)ともに変異が検出されなかったのに対し、日本人では149名中1名がヘテロ型の変異を保有していた。これらの結果より、

CYP3A4*6の遺伝子頻度は、日本人が0.34%、黒人種が0%、白人種が0%であることが示された。

一方、OATP-C*5とOATP-C*15のを導入発現したHEK293細胞におけるプラバスタチンの輸送活性はOATP-C*5、OATP-C*15のいずれについても野生型の1/6以下の大きな低下を示したが、低下の程度に大きな差は認められなかった。

2) UGT1A1

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のハプロタイプの頻度の人種差を検討することを目的に、白人種、黒人種、日本人各150人分の末梢血より抽出したDNAより、UGT1A1*28、UGT1A1*6及びUGT1A1*27の遺伝子型をパイロシーグエンス法で決定し、アレル頻度の人種間差を検討した。

その結果、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、どの人種も6回及び7回の繰り返し型が主であったが、野生型の頻度は日本人で最も高く黒人種で最も低かった。また、黒人種では、5回及び8回の繰り返し型のアレル頻度はそれぞれ5%程度あり、これらの変異型は日本人及び白人種では稀であることから、UGT1A1*28に関しては黒人種の変異が最も多様性に富んでいた。

一方、UGT1A1*6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、日本人においては変異型のアレル頻度は約15%と高かった。同様に、UGT1A1*27は、日本人で検出されたが、他の人種では検出されなかった。

しかし、黒人種でUGT1A1*27と同一のポジションに新規の変異(P229L)が新

たに見つかった。In vitro機能解析の結果、P229Lは野生型に比較して、蛋白の安定性及び酵素活性がともに低いことが示された。

3) トランスポーター

8種類のトランスポーター：BCRP (breast cancer resistance protein), OATP-B (organic anion transporting polypeptide-C), OATP8, MDR1 (multi-drug resistance 1), OCT1 (organic anion transporter 1), OCT2, OCT3, MRP4 (multidrug resistance associated protein 4)、を対象として遺伝子解析を行った。その結果、本検討で同定した変異の頻度は、日本人で高い傾向にあり、人種間の比較では、日本人と黒人における頻度は同程度であるケースが多いものの、白人とでは大きな差が見られる傾向にあった。

4) CYP2C9

CYP2C9の遺伝子多型は、2003年度終了時点で、CYP2C9*2から*12までの変異が、報告され登録されている。今年度は、黒人集団を対象としてCYP2C9*2、*3、*4、*5、*6、*11の変異解析を行った。その結果、黒人種では150人中CYP2C9*3アレル保有者3名、CYP2C9*5と*6保有者をそれぞれ1名(別人)、*11保有者を11名検出した。これらの対象者は全てヘテロ接合体であった。CYP2C9*4と*5の変異は検出されなかった。

CYP2C9の5'上流領域解析では、黒人は白人およびアジア人と異なる上流領域配列を有しており、CYP2C9*3保有者においては-1912がT/Tであり、従来白人およびアジア人で得られた上流配列パターン(P)6-1またはP6-2とは異なるため、新たにP6-3を設定した。また、翻訳領域が*1/*5と*1/*6の対象者では上流パターンは従来のP1とP2に相当する配列であったため、新たにP1-2とP2-2を設定した。更に、*1/*11を有する黒人では上流域の

パターンは P2(2名)、P3(5名)であったため、それぞれ P2-3 と P3-2 を設立した。

D. 考察

1) CYP3A4 と OATP-C

日本人においてのみ変異遺伝子が検出された。CYP3A4*6は、これまで中国人での検討以外に報告が無い。今回の結果から CYP3A4*6 変異は、頻度は低いもののアジア人特有の変異である可能性が考えられた。また、この変異は 1塩基挿入型で、フレームシフトが起こり、その結果、ストップコドンを形成する。従って、頻度は低いものの、CYP3A4*6を持つ個体では CYP3A4 酵素の機能低下を引き起こし、薬物代謝能の個人差の一因となっている可能性が考えられた。

一方、OATP-C*15は日本人に多い変異であるが、白人種では日本人で認められていない OATP-C*5が存在する。今回の結果から OATP-C*5 と OATP-C*15のいずれも同程度の活性低下を引き起こすことから、OATP-C*5 と OATP-C*15を足した頻度で考えるのが人種差を考える基本になると考えられた。その場合、OATP-C*5 と OATP-C*15を足した頻度は日本人で最も高く (15%)、日本人の頻度は白人種の約二倍、黒人種の約 10 倍の頻度であり、これらの遺伝子変異に起因する OATP-C の機能低下者の頻度や OATP-C の平均的な機能に人種差が生じる可能性が示された。

2) UGT1A1

今回検討を行った UGT1A1*28、UGT1A1*6 および UGT1A1*27 の中では、UGT1A1*28 のアレル頻度の人種間差が最も大きかった。UGT1A1*28 は抗ガン剤イリノテカンの活性代謝物である SN-38 の代謝速度と相関を有することから、UGT1A1 が代謝に関与する新薬の承認審査にあたっては、その人種間差を十分考慮に入れる必要がある。

UGT1A1*6は、日本人に特異的な SNP で

あり、UGT1A1*28よりは影響の程度は低いが、ビリルビン・レベルの上昇及び SN-38 の代謝速度を低下させる傾向が報告されていることから、新薬の承認審査にあたっては、考慮する必要がある。

一方、UGT1A1*27は、頻度が非常に少なく、また、UGT1A1*28 とリンクしている可能性が高いので、特別な配慮は不必要かもしれないが、さらにハプロタイプの解析が必要であろう。

3) トランスポーター

今回、日本人での頻度が全般的に高い傾向にあったが、その理由は、我々が日本人 DNA を用いて多型解析を行った結果を基に他人種との比較を行ったためと考えられる。実際、現在までに、BCRP, OATP-B, OATP8, OCT1, OCT2 遺伝子の白人での多型解析が報告されているが、その結果を見ると、白人特有の変異の存在が見られる。従って、本研究の知見とこれらの結果を総合評価することで、詳細な多型の人種間分布が整理されるものと思われる。

しかし、今回の結果から見ると今回検討を行ったトランスポーターの変異遺伝子の頻度は(日本人≒黒人)>白人の傾向にあり、体内動態や薬効を評価する際の参考になるものと思われる。

一方、頻度の情報は機能の情報が合って初めて人種差の判定に役立つ。例えば、BCRP の発現量(mRNA&タンパク)は、421A/A や 376T/T 型で有意に低下する。また、基質薬物を使用した臨床試験においては、376 変異を有する被検者で高い血中濃度が得られ、腸管での吸収促進や胆管への排出低下が示唆される。これらの変異は、日本人に特徴的な変異と言える。MDR1 遺伝子では、胎盤での発現量に関する haplotype 1, 2, 3 の頻度は日本人では、44.7, 4.3, 5.3%であるが、白人では、92.3, 0, 0%であった。このことから、両トランスポー

ターが関与する薬物の体内動態や薬効は人種間で異なると考えられる。

4) CYP2C9

今回検討を行った変異においては、黒人種では従来の報告とほぼ類似した変異頻度であることが明らかとなった。しかし、上流領域の変異については黒人の場合、白人およびアジア人とは一部異なるパターンを示すことが明らかとなった。

今年度までの検討から、各人種の変異アレル種と頻度が明らかになったため、CYP2C9遺伝子の翻訳領域と上流領域の変異の組み合わせでハプロタイプ解析を施行することが可能になったことから、次年度はハプロタイプの面からも人種差を検討する予定である。

E. 結論

1) CYP3A4*6は、発現頻度は低いものの、日本人を含むモンゴル人種に特有の変異である可能性が示唆された。

2) OATP-C*5とOATP-C*15に起因するOATP-Cの機能低下者の頻度は日本人で最も高く、OATP-Cの平均的な機能も日本人では低い可能性が示唆された。

3) UGT1A1*28には大きな人種差が存在するためUGT1A1が代謝に関与する新薬の承認審査にあたっては、その人種間差を十分考慮に入れる必要がある。

4) 同様にUGT1A1*6は、日本人に特異的なSNPであり、UGT1A1*28よりは影響の程度は低い、ビリルビン・レベルの上昇及びSN-38の代謝速度を低下させる傾向が報告されていることから、新薬の承認審査にあたっては、考慮する必要があると考えられた。

5) トランスポーターに関しては変異遺伝子の発現頻度が日本人で高い傾向が認められ、さらに、(日本人>黒人)>白人の傾向が認められた。しかし、トランスポーター遺伝子多型情報に加えて、機能評価の蓄積と整理が、安

全で有効な医薬品の開発、導入のために必須であると考えられた。

6) CYP2C9に関してはCYP2C9*2、*3、*4、*5、*6、*11、及び上流域の変異解析を完了した。来年度はハプロタイプの解析に進む予定である。

F. 研究発表

Kobayashi K., Urashima K., Shimada N., Chiba K. Selectivities of human P450 inhibitors toward rat P450 isoforms: study with cDNA-expressed systems of the rat. *Drug Metab Dispos* 31: 833-836, 2003

Senda C., Toda S., Tateishi M., Kobayashi K., Igarashi T., Chiba K. Mexiletine carbonyloxy β -D-glucuronide: a novel metabolite in human urine. *Xenobiotica* 33:871-84, 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 on CYP activity *in vivo*. *Life Science* 73:3201-3212, 2003

M. Saeki, Y. Saito, H. Jinno, M. Tohkin, K. Kurose, N. Kaniwa, K. Komamura, K. Ueno, S. Kamakura, M. Kitakaze, S. Ozawa and J. Sawada. Comprehensive UGT1A1 genotyping

in a Japanese population by
Pyrosequencing. Clin. Chem., 49,
1182 – 1185, 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 73: 554-565, 2003.

Takane H, Ieiri I, Otsubo K. Genetic
polymorphism of organic anion and
cation transporters: pharmacokinetic
and pharmacodynamic consequences
in pharmacotherapy. Curr
Pharmacogenomics, 1: 245-257, 2003

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.

Takahashi H, Echizen H: Pharmacogenetics
of CYP2C9 and interindividual variability
in anticoagulant response to warfarin.
Pharmacogenomics J, 3:202-14, 2003.

千葉 寛、家入一郎；薬物動態の薬理ゲ
ノミクス、ゲノム医学、3, 229-235,
2003.

家入一郎；トランスポーターの臨床域意
義－遺伝子多型から見る薬物療法への寄
与、ファルマシア、.39, 427-430, 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

H. 健康危険情報

なし

別添5

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 医薬品の効果と副作用に関係するデータのブリッジングには、人種的な薬物動態と感受性の差異の検討が不可欠である。特に、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は近年長足の進歩を遂げておる。本研究の分担研究において、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、特にその遺伝子多型の動態への影響と臨床的な意義付けが明確である CYP2C9 の遺伝子多型について検討した。現時点までに、最も多種の多型が報告されている黒人について共同入手した DNA 試料を用いて検討した。その結果、黒人においては、CYP2C9*2 は検出できないが、*3 と *5、*6、*11 が検出された。更に、黒人試料において CYP2C9 の 5' 上流部位の解析を加えたところ、黒人は翻訳領域の多型に対応する上流域配列において白人およびアジア人と異なる配列を有することが明らかとなった。

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ングするためには、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実施する事とした。

B. 研究方法

白人、黒人、アジア人サンプルに関しては、協同入手した試料と国内で施設内倫理委員会の了承を受けた上で収集した試料を用いた。

今年度は、黒人試料を中心に CYP2C9 翻訳領域および 5' 上流領域の多型を検討した。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、*5、*11 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、Kiddes らの PCR-RFLP 法により解析したが、その際の陽性対照試料には Joyce Goldstein から好意にて提供された CYP2C9*6 試料を用いた。

C. 研究結果

黒人試料 150 名に対して検討を加えた結果、CYP2C9*3 アレル保有者 3 名、CYP2C9*5 と *6 保有者をそれぞれ 1 名（別人）、*11 保有者を 11 名検出した。これらの対象者は全てヘテロ接合体であった。また、CYP2C9*4 と *5 の変異は検出されなかった。

CYP2C9 の 5' 上流領域解析では、黒人は白人およびアジア人と異なる上流領域配列を有しており、CYP2C9*3 保有者においては -1912 が T/T であり、従来白人およびアジア人で得られた上流配列パターン (P)6-1 または P6-2 とは異なるため、新たに P6-3 を設定した。また、翻

訳領域が*1/*5 と*1/*6 の対象者では上流パターンは従来の P1 と P2 に相当する配列であったため、新たに P1-2 と P2-2 を設定した。更に、*1/*11 を有する黒人では上流域のパターンは P2(2名)、P3(5名)であったため、それぞれ P2-3 と P3-2 を設立した。

D. 考察

CYP2C9 の遺伝子多型は、2003 年度終了時点で、CYP2C9*2 から*12 までの変異が、命名委員会のホームページ上に主として Goldstein の研究室から報告され登録されている。今年度は、黒人集団を対象として CYP2C9*2、*3、*4、*5、*6、*11 の変異解析を完了した。その結果黒人集団においては、これらの変異においては、従来の報告とほぼ類似した変異頻度が観察された。また、上流領域の変異も併せて検討したところ、黒人は、白人およびアジア人とは一部異なるパターンを示すことが明らかとなった。今年度までの検討から、各人種の変異アレル種と頻度が明らかになったため、CYP2C9 遺伝子の翻訳領域と上流領域の変異の組み合わせでハプロタイプ解析を施行することが可能になった。次年度は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 分子種の変異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

試料の収集は初年度で終了しており、第二年度におい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.

Takahashi H, Echizen H: Pharmacogenetics of CYP2C9 and interindividual variability in anticoagulant response to warfarin. Pharmacogenomics J, 3:202-14, 2003.

Takahashi H, Ieiri I, Wilkinson GR, Mayo G, Kashima T, Kimura S, Otsubo K, Echizen H: 5'-Flanking region polymorphisms of CYP2C9 and their relationship to S-warfarin metabolism in Caucasian and Japanese patients, Blood Dec. 30 (e-publication ahead of print).

2. 学会発表

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(医薬品等医療技術リスク評価研究事業)
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授・副薬剤部長

研究要旨: 日本人、白人、黒人より採取したDNAを用い、*BCRP*, *OATP-B*, *OATP8*, *MDR1* (promoter region), *OCT1*, *OCT2*, *OCT3*, *MRP4*, 8種類の薬物輸送タンパク遺伝子に見られる変異の人種間比較を行った(一部、進行中、資料添付)。また、*BCRP*と*MDR1*では、ヒト組織での発現量あるいは健康成人を対象とした臨床試験により、その影響についての知見を得た。現在、*OCT1*, *OCT2*のヒトでの機能評価を実施している。本検討を通して、アミノ酸置換を伴う変異を数多く同定したが、全体的な特徴として、(1) 殆どの変異で、日本人での頻度が高い傾向にあった。これは、日本人のDNAを中心に多型解析を実施しているためと考えられ、他人種に特有な変異の存在に留意する必要がある。(2) 3人種間では、黒人での頻度が日本人の値に近く、白人との間には大きな頻度差を示す場合が多かった。これら知見の意義を*BCRP*を例に考察する。376位や421位の変異がタンパク発現量の低下を招き、基質薬物の体内動態においても変動の原因となるが、両変異はいずれも日本人で頻度が有意に高く、体内動態や効果の人種間差の原因となることが示唆される。さらに、他の遺伝子についても同様な情報を蓄積することで、安全で有効な医薬品の開発、導入が図られると言える。

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。日本人由来のDNAを用い、Cording regionsを中心にオリジナルなprimerによる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。簡便な遺伝子診断として、変異を特異的に検出するprobe (TaqMan probe)を作成の後、sequence detection systemによる方法を殆どの変異部位について確立した。(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・遺伝子解析研究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絡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

BCRP (breast cancer resistance protein), *OATP-B* (organic anion transporting polypeptide-B), *OATP8*, *MDR1* (multi-drug resistance 1), *OCT1* (organic cation transporter 1), *OCT2*, *OCT3*, *MRP4* (multidrug resistance associated protein 4)、以上8種類のトランスポーターを対象として遺伝子解析を実施した。1検体につき、total 100箇所以上のPCRを実施したことになるが、いずれのPCRも特異的に増幅されていた。Table (添付資料)には、本検討で同定した変異のうち、アミノ酸の置換を伴う変異のみを抜粋して示した。表中のブルーの箇所は、ヒト臓器での発現量、あるいは健康成人での臨床試験により、各変異の機能への影響について検討を加えた遺伝子を、ピンクの箇所は現在、検討中の遺伝子を示している。一部、検討中の箇所があるが、以下の特徴が見られた:(1) 多くの変異部位について指摘できることであるが、本検討で同定した変異の頻度は、日本人で高い傾向にあった。(2) 人種間の比較では、日本人と黒人における頻度は同程度であるケースが多いものの、白人とでは大きな差が見られる傾向にある。

D. 考察

(1)日本人での頻度が全般的に高い傾向にあったが、日本人DNAを用いて多型解析を行ったためと考えられる。留意点として、他人種に特有な変異の存在が指摘される。現在までに、*BCRP*, *OATP-B*, *OATP8*, *OCT1*, *OCT2*遺伝子の白人での多型解析が報告されている。その結果を見ると、白人特有の変異の存在が見られる。従って、本研究の知見とこれらの結果を総合評価することで、詳細な多型の人種間分布が整理される。(2)頻度は(日本人=黒人)>白人の傾向にあり、体内動態や薬効を評価する際に注意する必要がある。例えば、ヒト胎盤を用いた検討では、*BCRP*の発現量(mRNA&タンパク)は、421A/Aや376T/T型で有意に低下する。また、基質薬物を使用した臨床試験においては、376変異を有する被検者で高い血中濃度が得られ、腸管での吸収促進や胆管への排出低下が示唆される。これらの変異は、日本人に特徴的な変異と言える。*MDR1*遺伝子では、promoter領域に存在する変異の詳細な解析を行ったが、胎盤での発現量に関するhaplotype 1,2,3の頻度は日本人では、44.7, 4.3, 5.3%であるが、白人では、92.3, 0, 0%であった。このことから、両トランスポーターが関与する薬物の体内動態や薬効は人種間で異なると思われる。以上のことから、トランスポーター遺伝子多型情報とともに、機能評価の蓄積と整理が、安全で有効な医薬品の開発、導入のために必須と言える。

E. 結論

8種類の薬物トランスポーター遺伝子の多型解析を行った結果、以下の特徴が見られた:(1)同定した変異の頻度は日本人で高い傾向にあった。(2)日本人と黒人の頻度は同程度であるケースが多いが、白人とでは明らかに頻度が異なる。以上の点から、有効な医薬品の開発と導入には遺伝子情報とともに、機能評価も併せて整理する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

別紙一覧を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在までに、出願、登録はない。

研究発表一覧

学会発表

- 1 高根 浩、家入一郎、紀川純三ら;MDR1遺伝子発現の個人差に及ぼす遺伝子多型およびエピジェネティックスの影響、第18回日本薬物動態学会年会、札幌、2004年10月。
- 2 小林大介、家入一郎、高根 浩ら;BCRP遺伝子多型解析と機能評価、第18回日本薬物動態学会年会、札幌、2004年10月。

論文発表および寄稿

- 1 Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H., et al. Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: Consequences for pravastatin pharmacokinetics. Clin Pharmacol Ther, 2003; 73: 554-565.
 - 2 Takane H, Ieiri I, Otsubo K. Genetic polymorphism of organic anion and cation transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy. Curr Pharmacogenomics, 2003; 1: 245-257.
 - 3 Ieiri I, Takane H, Otsubo K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. Clin Pharmacokinet, in press.
- a 家入一郎;トランスポーターの臨床域意義—遺伝子多型から見る薬物療法への寄与、ファルマシア、Vol.39, 427-430, 2003.
- b 千葉 寛、家入一郎;薬物動態の薬理ゲノミクス、ゲノム医学、Vol.3, 229-235, 2003.
- c 家入一郎、大坪健司;薬物トランスポーターの遺伝的多型と臨床的意義、臨床検査、Vol. 48, 印刷中。

Table Genetic polymorphisms in various human transporters and their frequencies among three racial populations

transporter gene	location	nucleotide sequence		mutant (M)	effect	Japanese (n=100-150)				Caucasian (n=100-150)				African (n=100-150)			
		wild type (W)	mutant (M)			W/W	W/M	M/M	allelic freq.	W/W	W/M	M/M	allelic freq.	W/W	W/M	M/M	allelic freq.
BCRP	exon 2	34	cccaGgtc	cccaAtgc	12Val>Met	67.5	30.8	1.7	0.17	92.7	7.3	0	0.04	88	11.3	0.7	0.06
	exon 4	376	ggtaCaagt	ggtaTaagt	126Gln>Stop	98.3	1.7	0	0.01	100	0	0	0.00	100	0	0	0.00
	exon 5	421	cttaCagtt	cttaAagtt	141Gln>Lys	50.8	37.5	11.7	0.30	80.7	16.7	2.7	0.11	96	3.3	0.7	0.02
	exon 2	76	GAAAACACA	deletion	deletion	-	-	-	0.07	-	-	-	nd	-	-	-	nd
	exon 2	109	agacCctca	agacActca	37Pro>Thr	-	-	-	0.01	-	-	-	nd	-	-	-	nd
OATP-B	exon 5	601	gggcGggg	gggcAggg	201Val>Met	-	-	-	0.04	-	-	-	nd	-	-	-	nd
	exon 7	935	cggcGaaag	cggcAaaag	312Arg>Gln	-	-	-	0.33	-	-	-	nd	-	-	-	nd
	exon 9	1175	gccaTctc	gccaCctc	392Ile>Thr	-	-	-	1.00	-	-	-	1.00	-	-	-	1.00
	exon 10	1457	cigtCtcca	ctgtTcca	486Ser>Phe	-	-	-	0.31	-	-	-	0.14	-	-	-	0.37
	exon 3	334	gacaCtft	gacaGctt	112Ser>Ala	-	-	-	0.70	-	-	-	0.76	-	-	-	0.49
OATP8	exon 6	699	aaatGtaag	aaatAtacg	233Met>Ile	-	-	-	0.70	-	-	-	0.70	-	-	-	0.49
	-1517	agggTttaa	agggCttaa	aggcCttaa	-	84.0	16.0	0.0	0.08	100.0	0.0	0.0	0.00	nd	nd	nd	nd
MDR1	-1459	gtgaGataa	gtgaAataa	gtgaAataa	-	55.3	39.4	5.3	0.25	100.0	0.0	0.0	0.00	nd	nd	nd	nd
	-1423	cagaGAtcat	deletion	deletion	-	100.0	0.0	0.0	0.00	99.0	1.0	0.0	0.01	nd	nd	nd	nd
	-1132	aagaCCATCctg	deletion	deletion	-	92.6	7.4	0.0	0.04	100.0	0.0	0.0	0.00	nd	nd	nd	nd
	-1017	atggTgta	atggCgta	atggCgta	-	84.0	16.0	0.0	0.08	96.9	3.1	0.0	0.02	nd	nd	nd	nd
	-824	attaTggct	attaCggct	attaCggct	-	98.9	1.1	0.0	0.01	100.0	0.0	0.0	0.00	nd	nd	nd	nd
	-755	agtgAtttt	agtgGttt	agtgGttt	-	100	0.0	0.0	0.00	99.0	1.0	0.0	0.01	nd	nd	nd	nd
	-41	cccaAtgat	cccaGtgat	cccaGtgat	-	79.8	19.1	1.1	0.11	100.0	0.0	0.0	0.00	nd	nd	nd	nd
	-145	gaagCctga	gaagGctga	gaagGctga	-	93.6	6.4	0.0	0.03	100.0	0.0	0.0	0.00	nd	nd	nd	nd
	-129	cgagTtagcg	cgagCagcg	cgagCagcg	-	84.0	16.0	0.0	0.08	96.9	3.1	0.0	0.02	nd	nd	nd	nd
	exon 2	533	tcttGtttg	tcttGtttg	160Leu>Phe	-	2.01	17.7	80.2	0.89	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
hOCT1	exon 6	1075	caagcGggc	caagcTggc	341Pro>Leu	68.8	30.2	0.01	0.16	96.9	3.1	0.0	0.02	80.2	17.7	0.4	0.10
	exon 7	1222	tgccAgtca	tgccGgtca	48Met>Val	4.7	26.0	69.8	0.83	19.8	49.0	31.3	0.56	3.13	41.7	55.2	0.76
	exon 3	601	ctataCgtga	ctataTgtga	200Thr>Met	97.9	2.10	0.0	0.01	100.0	0.0	0.0	0.00	100.0	0.0	0.0	0.00
hOCT2	exon 4	808	cagttTctg	cagttGctg	270Ser>Ala	100	22.9	76.0	0.88	2.08	4.6	83.3	0.91	3.12	24.0	72.9	84.9
	exon 7	1270	tgtcActg	tgtcTcgcg	424The>Ser	99.0	1.0	0.0	0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
MRP4	exon 4	511	T	G	171Cys>Gly	100.0	0.0	0.0	0.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	exon 5	559	G	T	187Gly>Trp	70.0	26.0	4.0	0.17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	exon 8	912	G	T	304Lys>Asn	62.0	28.0	10.0	0.24	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	exon 18	2269	G	A	757Cln>Lys	62.0	36.0	2.0	0.40	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	exon 21	2478	G	A	860Val>Met	98.0	2.0	0.0	0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
exon 25	3095	C	G	1032Pro>Arg	98.0	2.0	0.0	0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

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 のハプロタイプの頻度の人種差を検討することを目的に、白人種、黒人種、日本人各 150 人分の末梢血より抽出した DNA より、UGT1A1*28、UGT1A1*6 及び UGT1A1*27 の遺伝子型をパイロシーケンス法で決定し、アレル頻度の人種間差を検討した。日本人における 3 箇所の変異の頻度は、報告値とほぼ一致した。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、どの人種も 6 回及び 7 回の繰り返し型が主であったが、野性型の頻度は日本人で最も高く黒人種で最も低かった。また、黒人種では、5 回及び 8 回の繰り返し型のアレル頻度はそれぞれ 5 % 程度あり、これらの変異型は日本人及び白人種では稀であることから、UGT1A1*28 に関しては黒人種の変異が最も多様性に富んでいた。UGT1A1*6 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、日本人においては変異型のアレル頻度は特異的に約 15% と高かった。UGT1A1*27 は、日本人で検出された。他の人種ではこの変異は検出されなかったが、UGT1A1*27 と同一のポジションで、黒人種において新規の変異 (P229L) が新たに見つかった。In vitro 機能解析の結果、P229L は野生型に比較して、蛋白の安定性及び酵素活性がともに低いことが示唆された。

UGT1A1*27 のアレル頻度は低く、また、UGT1A1*28 との強いリンクが今回の結果及び他の報告より示唆されているので、日本人においては、消失に UGT1A1 が主として関与するような薬物にあっては、UGT1A1*28 と UGT1A1*6 に注目する必要があると考えられた。

今後更にポジション-3279（転写調整領域）及び 1941（3'非コード領域）の 2 カ所の遺伝子型を決定して、UGT1A1 のハプロタイプの頻度の人種間差を検討する予定である。

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が、医薬品の体内動態には人種差が存在することが知られており、新医薬品の承認審査においては、国外で得られた臨床試験の結果から、日本人における

医薬品の効果と安全性を外挿できるとは限らない。しかし、体内動態の人種差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

が得られておらず、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言える。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、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。

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。グルクロン酸抱合反応は、第II相の代謝の約40%を占めている。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 遺伝子は、UGT1A1、UGT1A3、UGT1A4、UGT1A5、UGT1A6、UGT1A7、UGT1A8、UGT1A9、UGT1A10の9個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。²⁾

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

ーゲ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。²⁾ 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。³⁻⁵⁾

UGT1A1には、現在までに60以上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。²⁾ この中で、日本人で頻度の高い変異は、-3279T>G (UGT1A1*60)を含む転写調整領域における数カ所の変異、プロモータ領域における(TA)_{6>7}の変異(UGT1A1*28)、211G>A (G71R, UGT1A1*6)及び3'非コード領域の数カ所の変異である。また、頻度は高くないが、アミノ酸置換を伴う変異686C>A (P229Q, UGT1A1*27)も報告されている。⁶⁾ これらは、*in vitro*機能解析によって、抗癌剤イリノテカンの活性代謝物SN-38の代謝活性が低下することが確認されている。^{7, 8)} これらの変異の幾つかは互いに強くリンクし、同一の染色体上に存在している。佐井らは、日本人におけるUGT1A1のハプロタイプを決定し、ハプロタイプがSN-38とその代謝物であるSN-38GのAUC比及び定常状態におけるビリルビン・レベルと関連があることを見いだした。⁶⁾ そのため、UGT1A1に関してはハプロタイプとPK/PDとの関連を検討することが重要と考えられるので、本研究では、UGT1A1のプロモータ領域、3'非コード領域、及び、ポジション-3279、211、

686 における遺伝子型をパイロシーケンス法で決定し、日本人、白人種及び黒色人種間で、ハプロタイプの頻度を比較することとした。今年度は、測定が終了したプロモータ領域、ポジション 211、686 における各変異種の頻度を報告するとともに、昨年度黒人種で発見した新規 SNP、686C>T (P229L)の *in vitro* 機能解析の結果を報告する。

B. 研究方法

(1) 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。

(2) DNA 抽出

定法に従い末梢血より DNA を抽出した。

(3) 遺伝子のタイピング

1) パイロシーケンス法による遺伝子のタイピング⁹⁾ : Table 1 に示した forward 又は reverse の一方をビオチン修飾した PCR 増幅用プライマーと Ex-Taq (宝酒造) 1 unit を用いて、DNA (10–15 ng) を鋳型として、UGT1A1 の TATA box、翻訳開始点より 211 番目の塩基、翻訳開始点より 686 番目の塩基の周辺部分を増幅させた。PCR の条件は以下の通りである : 94°C (5 min) – {94°C (30 sec) – 58°C (45 sec) – 72°C (30 sec)} x 50 cycles。PCR 産物は、結合用緩衝液 (2x; 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L

EDTA, 2mol/L NaCl, 1 mL/L Tween 20, pH 7.6) 中で 10 分間反応させ Streptavidin-セファローズビーズ (Amersham Biosciences AB) に結合させた。ビーズを MultiScreen-HV Plate (Millipore Corporation) に移し、結合用緩衝液を吸引除去した。ビーズに結合した DNA に変性用試薬 (0.2 mol/L NaOH) 50 μ L を加え 1 本鎖としたのち、洗浄用緩衝液 (10 mmol/L Tris acetate, pH 7.6) 150 μ L で 2 回洗浄した。1 本鎖 DNA の結合したビーズをアニーリング用緩衝液 (20 mmol/L Tris acetate, 2 mmol/L magnesium acetate, pH 7.6) 50 μ L に懸濁させた後、懸濁液を 96 穴の PSQ plate (Pyrosequencing AB) に移し、10 pmol のシーケンス用プライマー (Table 1) を添加した。96 穴の PSQ plate を 95°C で 2 分間加熱した後、室温に戻し、このプレートを PSQ™ 96MA (Pyrosequencing AB) に挿入して、各ポジションのタイピングを行った。SNP リージェントキットはバイオット社製を用いた。

2) ダイレクト・シーケンス法 : Table 1 に示したプライマーを用いて、佐伯らの方法で行った。¹⁰⁾ 2.5 unit の Z-Taq (宝酒造) を用いて DNA (150 ng) から UGT1A1 を PCR で増幅した。PCR の条件 : {99°C (5 sec) – 55°C (5 sec)} x 30 cycles – 72°C (190 sec)。PCR 産物を 0.625 unit の Ex-Taq (宝酒造) を用いて更に PCR 増幅した。PCR の条件 : 94°C (5 min) – {94°C (30 sec) – 55°C (60 sec) – 72°C (2 min)} x 30 cycles。第 2 次 PCR 産物を PCR Product Pre-Sequencing Kit (USB Co.) で精製し、ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と

Table 1 に示したプライマーを用いて、両方向に延伸させた。過剰の色素は DyeEx96 Kit (Qiagen) で除去した。溶離物を ABI Prism 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) で解析した。

(4) UGT1A1 の *in vitro* 機能解析

UGT1A1 の *in vitro* 機能解析は、神野らの報告に従って行った。¹¹⁾

1) プラスミドの構築：pcDNA3.1 にクローニングした UGT1A1 cDNA を鋳型にして、Table 1 に示したプライマーを用いて 2 回 PCR 増幅を行った。各 PCR に用いた試薬を Table 2 に示した。PCR の条件は以下の通りである。第一 PCR：94°C (5 min) - {94°C (15 sec) - 50°C (30 sec) - 68°C (1.5 min)} x 5 cycles、第二 PCR：94°C (5 min) - {94°C (15 sec) - 45°C (30 sec) - 68°C (1.5 min)} x 5 cycles - {94°C (15 sec) - 55°C (30 sec) - 68°C (1.5 min)} x 20 cycles - 68°C (7 min) - 4 °C。得られた断片は pDONR 201 Vector にクローニングした。pDONR/UGT1A1-WT の配列を確認した後に、Table 1 に示した mutation primer を用いて QuickChange Multi Site-directed Mutagenesis Kit で 686C>T (P229L) の変異を導入した。pDONR/UGT1A1-WT 及び pDONR/UGT1A1-P229L にクローニングされた UGT1A1 cDNA を pcDNA-DEST40 にサブクローニングした。

2) COS1細胞へのUGT1A1の導入：COS-1細胞を、10%ウシ胎児血清を含むDulbecco's modified Eagle's medium中で増殖させた。遺伝子を導入する前日に、COS-1細胞を100-mmディッシュに 5.5×10^4 cells/cm²の濃度で植え付けた。遺伝子導入前に培地を

Opti-MEM (Invitrogen)に交換した。

Opti-MEM (Invitrogen)で希釈したDNAをLipofectAMINE 2000試薬 (Invitrogen)と混合し20分間室温で振盪し、この混合液を、COS-1細胞を植え付けたディッシュに添加した。各遺伝子について、各回4枚のディッシュを用いて遺伝子導入し、これを3回繰り返した。

48時間後に、COS-1細胞を氷冷したリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄し、0.25M sucrose-5 mM Hepes, pH 7.4に回収した。細胞懸濁液を3回超音波で処理した後、膜画分を4°Cで60分間、105,000gで遠心分離した。沈殿物をsucrose緩衝液に懸濁させた後に、-80°Cで保存した。

3) Western Blotting：COS-1細胞から得た膜画分蛋白20 µgを10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelで電気泳動し、polyvinylidene difluoride膜に移行させた。UGT1A1はrabbit anti-human UGT1A (diluted at 1:2500; BD Gentest, Woburn)で免疫的に認識させ、horseradish peroxidase conjugated donkey anti-rabbit Ig (1:2500)とchemiluminescence-plus試薬(Amersham Biosciences Inc)で可視化した。蛋白負荷量の対照にはcalnexinを用いた。UGT1A1の検量線には、標品として遺伝子組み換え酵素 (BD Gentest) を用いた。

4) Real-time reverse transcription (RT)-PCR：COS-1細胞内より全RNAをRNase-free DNaseを添加したRNeasy Mini kit (Qiagen)で分離した。200 ngのRNAからoligo (dT) primerとMultiScribe逆転写酵素 (Applied Biosystems)を用いて、一次cDNA鎖を調製した。SYBR GreenによるRT-PCRアッセイは、ABI PRISM

7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いて行った。50 μL の反応混合液には、25 μL の SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)、転写した総 RNA 4 ng に相当する 2 μL の cDNA 及び 0.1 μM の各プライマー (Table 1) を含む。PCR の条件は 95°C (10 min) - {95°C (15 sec) - 60°C (1 min)} x 40 cycles。 β -actin の転写を内部標準に用いた。

5) 代謝活性の測定：野性型及び P229L の代謝活性は、埴岡らの方法¹²⁾に従って測定した。SN-38 (2.5-150 μM) を、50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4、COS-1 細胞の膜画分(100 μg の蛋白)、10 mM MgCl_2 とともに 37°C で 1 分間インキュベートし、5 mM UDP-glucuronic acid を添加することにより反応を開始させた。混合液は、37°C で 80 分間インキュベートし、100 μl の 10% (w/v) HClO_4 を添加することにより、反応を終了させた。反応液を 4°C で 10 分間、12,000g で遠心分離し、上澄液を 0.45 μm の polytetrafluoroethylene メンブランフィルターで濾過した後、ロ液を HPLC で分析した。

(5) 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

UGT1A ファミリーの遺伝子の染色体上の配列を Fig. 1 に模式的に示した。佐井らは、日本人における UGT1A1 の主なハプロタイプは、Fig. 1 に示した TATA ボックス、211G/A、686C/A、図には示していないが -3279T/G、及び、1941C/G (exon 5 の 3'非コード領域) の遺伝子型を指標として決まると報告した。⁸⁾ 本年度は、測定の終了した TATA ボックス、211G/A、及び 686C/A について、各遺伝子型の頻度を日本人、黒人、白人間で比較した結果を示すことにする。

各ポジションの遺伝子のタイピングは、短時間に多数のサンプルを処理できるパイロシーケンス法で行った。Fig. 2 に、TATA ボックスと 211G/A に関する典型的なパイログラムと理論的パターンを示した (佐伯らの文献⁹⁾より引用)。

(1) 各遺伝子多型の頻度

1) UGT1A1*28

UGT1A1*28 は UGT1A1 のプロモータ領域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