

が知られている (Fig. 1)。本研究のサンプルから推定された UGT1A1 のプロモータ領域における各遺伝子多型のアレル頻度とその 95%信頼限界を Table 3 に示した。日本人では、(TA)₆ と (TA)₇ のタイプしか観察されず、後者のアレル頻度は 0.097 であった。白人種では、(TA)₇ の頻度は 0.388 と日本人よりも高く、(TA)₅ 及び (TA)₈ が、それぞれ頻度は 0.017 及び 0.007 と低いと検出された。一方、黒人種では、(TA)₆ の頻度は 0.446 と 3 つの人種間では最も低く、(TA)₇ の頻度は (TA)₆ と同じであり、また、(TA)₅ 及び (TA)₈ の頻度はそれぞれ 0.044 と 0.064 と 3 つの人種間では最も高かった。

2) UGT1A1*6

UGT1A1*6 は、日本人の Gilbert 症候群の患者に多いとされる変異で、転写開始点より 211 番目の塩基が G より A に変わるもので、グリシンからアルギニンへのアミノ酸置換を伴う (Fig. 1)。この位置に関しては、白人種及び黒人種では、ほとんど変異型は存在しなかったが、日本人では変異型のアレル頻度の推定値は約 16% であった (Table 4)。日本人では野性型をヘテロ及びホモで持つヒトの比率は、それぞれ、0.25 前後及び 0.02~0.03 と計算されるが、今回の検体ではホモは 6 名おり、その確率は 0.020 であった。

3) UGT1A1*27

UGT1A1*27 は、翻訳開始点より 686 番目の塩基が C から A に変わるもので、プロリンからグルタミンへのアミノ酸置換を伴う (Fig. 1)。この変異は、Gilbert 症候群及び治療を要する中程度の高ビリルビン血症を引き起こす Crigler-Najjar 症候群タイプ II の日本人患者から見ついている。¹³⁾

この位置の変異のアレル頻度の推定値と 95%信頼限界を Table 5 に示した。UGT1A1*27 は、白人種では全く観察されなかった。日本人では、150 人中 1 名がヘテロで UGT1A1*27 を有していた。黒人種では既知の変異、686C>A (P229Q) は見つからなかったが、1 検体において別の塩基変換 C→T がパイロシーケンス法で検出された。この変異については、ダイレクト・シーケンス法によって確認を行った。この塩基変換は、プロリンからロイシンへのアミノ酸置換 (P229L) をもたらす。

(2) P229Q の *in vitro* 機能解析

本研究において、黒人種の検体から UGT1A1 の新規 SNP、686C>A (P229Q) が見つかったので、これを COS-1 細胞に発現させて機能解析を行った。Western Blotting の結果を Fig. 3 に示した。P229L の UGT1A1 蛋白発現量は、野性型に比較して約 60% であり、この差は統計的に有意であった。なお、既知の SNP である P229Q の蛋白発現量は野性型と同定であった。¹¹⁾ UGT1A1 の mRNA レベルを比較した結果を Fig. 4 に示した。UGT1A1 の変異種 686C>T の mRNA のレベルは野生種とほぼ同程度であったので、Fig. 3 において P229L の Western Blotting で 2 つのスポットが検出されたこと、及び、発現量が低下していたのは、mRNA が不安定であるというよりも、生成した蛋白の安定性が低いことが示唆された。Fig. 5 は、抗ガン剤イリノテカンの活性代謝物である SN-38 を基質として、野生種と P229L 種の酵素活性を比較した結果である。P229L の SN-38 の代謝活性が非常に低い。Table 6 に野生種と

P229L 種の kinetic parameter を示した。タンパク量で補正した後のクリアランス値 (V_{max}/K_m) より、P229L のクリアランスは野生種の約 3%であった。ちなみに、P229Q のクリアランスは野生種の 50%程度であったので、¹¹⁾P229L の活性の低下は P229Q よりも著しかった。

D. 考察

UGT1A1 のプロモータ領域では TA の繰り返し数によって、(TA)₅、(TA)₆、(TA)₇、(TA)₈ の 4 つのタイプが報告されている。この UGT1A1 の TATA ボックスで見られる 4 種の多型 (UGT1A1*28) に関する *in vitro* のリポーターアッセイでは、転写活性は、(TA)₅ では野性型よりも高く、(TA)₇ 又は (TA)₈ の変異では約半分であると報告されている。¹⁴⁾ また、TA の繰り返し数 7 又は 8 の変異は、軽度の高ビリルビン血症を伴う Gilbert 症候群と関連づけられている。^{5, 18)} Gilbert 症候群は、通常は治療の必要性はないとされるが、新生児黄疸の原因のひとつと言われている。UGT1A1*28 によるグルクロン酸抱合能の低下は、イリノテカン投与における重篤な副作用との関連も指摘されている。²⁻⁴⁾

UGT1A1*28 の発生頻度の人種差については既に幾つかの報告がある。^{3, 4, 6, 14-17)} 白人種については、(TA)₇ のアレル頻度は 0.32~0.39 であり、^{4, 14-15)} 今回用いたサンプルにおける観測値 0.388 はこの範囲に含まれていた。また、(TA)₅ 及び (TA)₈ が稀であることも一致した。黒人種については、(TA)₅、(TA)₆、(TA)₇ 及び (TA)₈ のアレル頻度の報告値は、それぞれ、0.04~0.09, 0.46~0.52,

0.35~0.43 及び 0.03~0.12 であった。^{4, 14-16)} 今回用いたサンプルにおける観測値は、それぞれ、0.044, 0.446, 0.446, 0.064 であり、ほぼ報告値と一致していた。日本人及び韓国人については、安藤ら⁴⁾、佐井ら⁶⁾、Kim et al.¹⁷⁾らの報告があるが、(TA)₇ のアレル頻度は、それぞれ、0.14, 0.13, 0.097 と報告されている。今回用いたサンプルの (TA)₇ のアレル頻度の推定値は 0.097 で Kim らの報告値と一致し、また、その 95%信頼区間の上限は安藤ら及び佐井らの報告値にほぼ一致した。安藤ら⁴⁾、佐井ら⁶⁾、Kim et al.¹⁷⁾らの報告においても (TA)₅ 及び (TA)₈ は検出されていないが、今回用いたサンプルでも (TA)₅ 又は (TA)₈ の保有は検出されなかった。

既に述べたように、UGT1A1*28 の変異は *in vivo* における SN-38 のグルクロン酸抱合反応速度に影響を及ぼし、このことが副作用の発現を左右することが示唆されている。UGT1A1 によってグルクロン酸抱合されることが薬物消失の主ルートである薬物は、SN-38 と同じような影響を受けることが懸念される。本研究でも明らかなように、このポジションに関係した遺伝子多型は、人種間差が非常に大きいので、医薬品のグルクロン酸抱合における平均値やばらつきの大きさの人種間変動の原因になり得ると考えられる。

UGT1A1*28 に比べて、UGT1A1*6 及び UGT1A1*27 のアレル頻度の人種間差については、あまり研究されていない。今回用いたサンプルの日本人の UGT1A1*6 アレル頻度の推定値は 0.157 であり、その 95%信頼区間は 0.116~0.198 であった。日本人

又は韓国人における *UGT1A1*6* のアレル頻度は 0.12~0.21 と報告されており、^{3,6,17)} 今回のサンプルの値はこの範囲に含まれていた。*UGT1A1*6* のアレル頻度は日本人に特異的に高く、今回のサンプルからは黒人種では検出されず、白人種で2名がヘテロで有しているに過ぎなかった。

In vitro 機能解析によれば、*UGT1A1*6* の転写活性又は SN-38 に対するグルクロン酸抱合活性は野性型の約 50~70 %であった。^{8,11,20)} また、*UGT1A1*6* をホモ又はヘテロで有するヒトの血漿中ビリルビンの濃度は、野性型をホモに有するヒトに比較して約 1.5 倍高いと言われている。¹⁸⁾ 一方、イリノテカンを投与された患者においては、*dose-limiting events* を発生させる頻度は野性型と有意な差はなかったという報告がある。⁴⁾ しかし、基質による相違もあることから、日本人に特異的に発現頻度が高い *UGT1A1*6* については、注意が必要であろう。

*UGT1A1*27* (P229Q) に関する *in vitro* 機能解析によれば、*UGT1A1*27* 蛋白発現量は野性型の *UGT1A1* よりもやや多かった。^{8,11)} しかし、その代謝活性については、野性型の 11%⁸⁾又は 73 %¹¹⁾と、やや開きのある結果が報告されている。日本人では、1名がヘテロで保有していた。日本人における *UGT1A1*27* (P229Q) の頻度は、0.005~0.013^{3,6)}と報告されており、今回の測定値はこれらと一致した。佐井らの報告では、*UGT1A1*27* がヘテロで2名検出されたが、これは *UGT1A1*28* と同一の染色体に載っていることが示唆された。⁶⁾ 今回のサンプルにおいて *UGT1A1*27* を保有していた1

名は、TATA ボックスについては(TA)_nをホモで有しており、*UGT1A1*27* が *UGT1A1*28* と同一の染色体上にあることが、今回の結果からも強く示唆された。*UGT1A1*27* (P229Q) は、今のところ日本人および台湾人以外での報告はなく、今回のサンプルからも、白人種及び黒人種からは検出されなかった。

今回、黒人種で *UGT1A1*27* と同一のポジションで別のタイプの変異、686C>T が検出された。この変異はアミノ酸の置換を伴う (P229L)。COS-1細胞を用いた *In vitro* 機能解析の結果、この変異は *UGT1A1* 蛋白の安定性を低下させ、また、酵素活性も野性型の 3 %で非常に低いことが判明した。P229L は既知の変異 *UGT1A1*27* (P229Q) よりも機能低下の程度は著しく、*in vivo* において、Gilbert 症候群や CN 症候群との関連が懸念される。

E. 結論

*UGT1A1*28*、*UGT1A1*6* および *UGT1A1*27* のアレル頻度の人種間差を明らかにした。

この中では、*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ので、新薬の承認審査にあたっ

ては、考慮する必要がある。

*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。

UGT1A1 には、多数の SNP や変異が報告されており、それらの変異の幾つかは連鎖している可能性が示唆されているので、今後引き続いて、*UGT1A* のハプロタイプの人種差を検討する予定である。

謝辞

本研究へご協力いただいた協力研究者の頭金正博博士、黒瀬光一博士、神野透人博士、斎藤嘉朗博士、香川聡子研究員、杉山永見子研究員及び佐伯真弓研究員に深謝致します。

参考文献

- 1) W.E. Evans et al., *Science*, **286**, 487 (1999).
- 2) R.H. Tukey & C.P. Strassburg, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 581 (2000).
- 3) L. Iyer et al., *Pharmacogenomics J.*, **2**, 43 (2002).
- 4) M. Ando et al., *Cancer Res.*, **60**, 6921 (2000).
- 5) F. Innocenti et al., *Pharmacogenetics*, **12**, 725 (2002).
- 6) K. Sai et al., *Clin. Pharm. Ther.* (in press).
- 7) L. Iyer et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **65**, 576 (1999).
- 8) J-F Gagne et al., *Mol. Pharmacol.*, **62**, 608 (2002).
- 9) M. Saeki et al., *Clin. Chem.*, **49**, 1182 (2003).

10) M. Saeki et al., *Drug Met. Pharmacokinet.*, **17**, 488 (2002).

11) H. Jinno et al., *Drug. Met. Dispos.*, **31**, 108 (2003).

12) Hanioka Net al., *Biomed Chromatogr* **15**, 328 (2001).

13) O. Koiwai et al., *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 1183 (1995).

14) E. Beutler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 8170 (1998).

15) K.Y. Fertrin et al., *Am. J. Med. Gen.*, **108**, 117 (2002).

16) C. Guillemette et al., *Cancer Res.*, **60**, 950 (2000)

17) HJ Kim et al., *Clin. Chem.*, **12**, 2078 (2003)

18) J. Sugatani et al., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **292**, 492 (2002)

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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).

2. 学会発表

黒瀬光一、頭金正博、長谷川隆一、佐伯真弓、斎藤嘉朗、越前俊宏、家入一郎、千葉寛、鹿庭なほ子。UGT1A1 遺伝子多型の人種差。日本薬学会第 124 年会、大阪、2004.3。

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

特になし

Table 1. Primers for UGT1A1 amplification used in this study

A. Pyrosequencing		Polymorphism	Primer name	Sequence, 5' to 3'
Amplification		TA repeat	bTATA-Fa	b-TCCCTGCTACCTTGTGGAC
			UGT1A1-TATA-R	GAGGTCGCCCTCTCCTACT
		211G>A (G71R)	bG71R-Fa	b-CAGCAGAGGGGACATGAAAT
		G71R-R	CAAAAACATTATGCCCGAGAC	
		686C>A (P229Q)	UGT1A1b-Left	TTTCTGTGGACGTGGTTTA
			bP229Q-Ra	b-GGGCCTAGGGTAATCCTTCA
Sequencing	Reverse	TA repeat	UGT1A1-TATA-SeqR	TCGCCCTCTCCTACTTATAT
	Reverse	211G>A (G71R)	UGT1A1-G71R-seqR	TTCAAGGTGTAAAATGCTC
	Forward	686C>A (P229Q)	UGT1A1-229SeqF	GACGTGGTTTATTCCC
B. Sequencing		Amplified region and polymorphism to be detected	Primer name	Sequence, 5' to 3'
First amplification	Forward		UGT1A1CAR-Ex5ZF	GGTGGTGGGAGTGAGTTTAGT
	Reverse		UGT1A1CAR-Ex5ZR	AGAGGGAAATAGTGGACAGAA
Second amplification	Forward	Exon 1	UGT1A11stF	TATCTCTGAAAGTGAACCTCCCTG
	Reverse	Exon 1	UGT1A11stR	GCACACAGAGTAAAATGTCCAA
Sequencing	Forward	686C>A (P229Q)	UT1A11F5	AGTACCTGTCTCTGCCCAC
	Reverse	686C>A (P229Q)	UT1A11R5	AGTGGATTTTGGTGAAGGCAG
C. Construction of plasmid for 686C>T			Primer name	
First amplification	Forward		<i>attB1_UGT1A1_F</i>	5'-AAAAAGCAGGCTGCAAAGCGCCATGGCTGT-3'
	Reverse		<i>attB2_UGT1A1_R</i>	5'-AGAAAGCTGGGTCTCAATGGGTCTTGGATTTGTGGG-3'
Second amplification	Forward		<i>attB1_Adaptor Primer</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'
	Reverse		<i>attB2_Adaptor Primer</i>	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'
Mutaion			Mutation primer	5'-Phospho-GCGACGTGGTTTATTCCCTGTATGCAACCCTTGCCCTC-3'
D. Real-time reverse transcription (RT)-PCR				
	Forward			5'-TAGTTGTCCTAGCACCTGACGC-3'
	Reverse			5'-TCTTTACATCCTCCCTTTGG-3'

Table 2 Reagent mixtures used in preparation of plasmid of UGT1A1-WT and -P229L

a) Reagent mixtures for the first PCR of UGT1A1-WT

Sterilized Water	39 μ L
10x <i>Pfx</i> Amplification Buffer	5 μ L
MgSO ₄ (50 μ M)	1 μ L
dNTP Mix (10 μ M each)	1.5 μ L
20 μ M <i>att</i> B1_UGT1A1_F	1 μ L
20 μ M <i>att</i> B2_UGT1A1_F	1 μ L
pcDNA/UGT1A1-WT	1 μ L
PLATINUM <i>Pfx</i> (2.5 U/ μ L)	0.5 μ L

b) Reagent mixtures for the second PCR of UGT1A1-WT

Sterilized Water	29 μ L
10x <i>Pfx</i> Amplification Buffer	4 μ L
MgSO ₄ (50 μ M)	1 μ L
dNTP Mix (10 μ M each)	1.5 μ L
20 μ M <i>att</i> B1_Adapter_Primer	2 μ L
20 μ M <i>att</i> B2_Adapter_Primer	2 μ L
PLATINUM <i>Pfx</i> (2.5 U/ μ L)	0.5 μ L
1 st PCR Mixture	10 μ L

c) Reagent mixtures for cloning the UGT1A1 fragment in pDONR 201 Vector

TE	6 μ L
5xBP Reaction Buffer	4 μ L
<i>att</i> B UGT1A1 Fragment	4 μ L
pDONR201 Vector (150 ng./mL)	2 μ L
BP Clonase Enzymes Mix	4 μ L

cDNA-Based Nucleotide Numbering in *UGT1A* Gene Complex

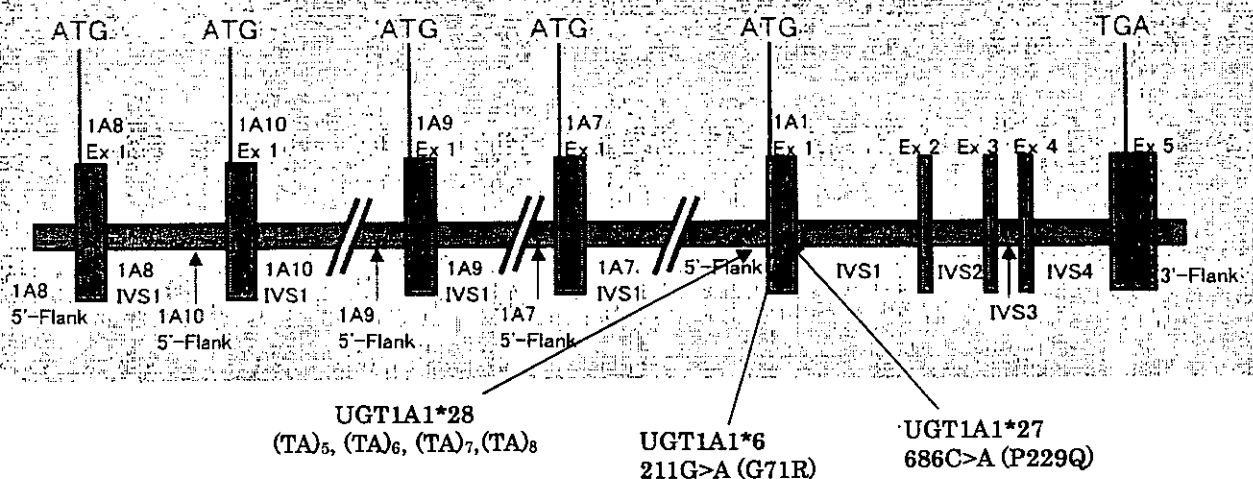


Fig. 1 A schematic structure of *UGT1As*

Table 3 Allele frequencies of UGT1A1*28 among three different ethnic groups

Ethnic Group Type	Caucasian* ¹	African-American* ²	Japanese* ³
(TA) ₅	0.017 (0.002,0.032)	0.044 (0.021,0.067)	0.000
(TA) ₆	0.588 (0.532,0.644)	0.446 (0.390,0.502)	0.903 (0.870,0.936)
(TA) ₇	0.388 (0.332,0.444)	0.446 (0.390,0.502)	0.097 (0.064,0.130)
(TA) ₈	0.007 (0.000,0.017)	0.064 (0.000,0.092)	0.000

Values in parentheses are 95 % confidence limits.

*¹ The number of chromosomes=294, *² the number of chromosomes =298, and *³ the number of chromosomes =300.

Table 4 Allele frequencies of UGT1A1*6 among three different ethnic groups

Ethnic Group Type	Caucasian* ¹	African-American* ¹	Japanese* ¹
Wild	0.993 (0.984,1.000)	1.000	0.843 (0.802,0.884)
Variant	0.007 (0.000,0.016)	0.000	0.157 (0.116,0.198)

Values in parentheses are 95 % confidence limits.

*¹ The number of chromosomes =300.

Table 5 Allele frequencies of UGT1A1*27 among three different ethnic groups

Ethnic Group Type	Caucasian* ¹	African-American* ²	Japanese* ¹
Wild	1.000	0.997 (0.991,1.000)	0.997 (0.991,1.000)
Variant (C→A)	0.000	0.000	0.003 (0.000,0.009)
Variant (C→T)	0.000	0.003 (0.000,0.009)	0.000

Values in parentheses are 95 % confidence limits.

*¹ The number of chromosomes =300, and *² the number of chromosomes =298.

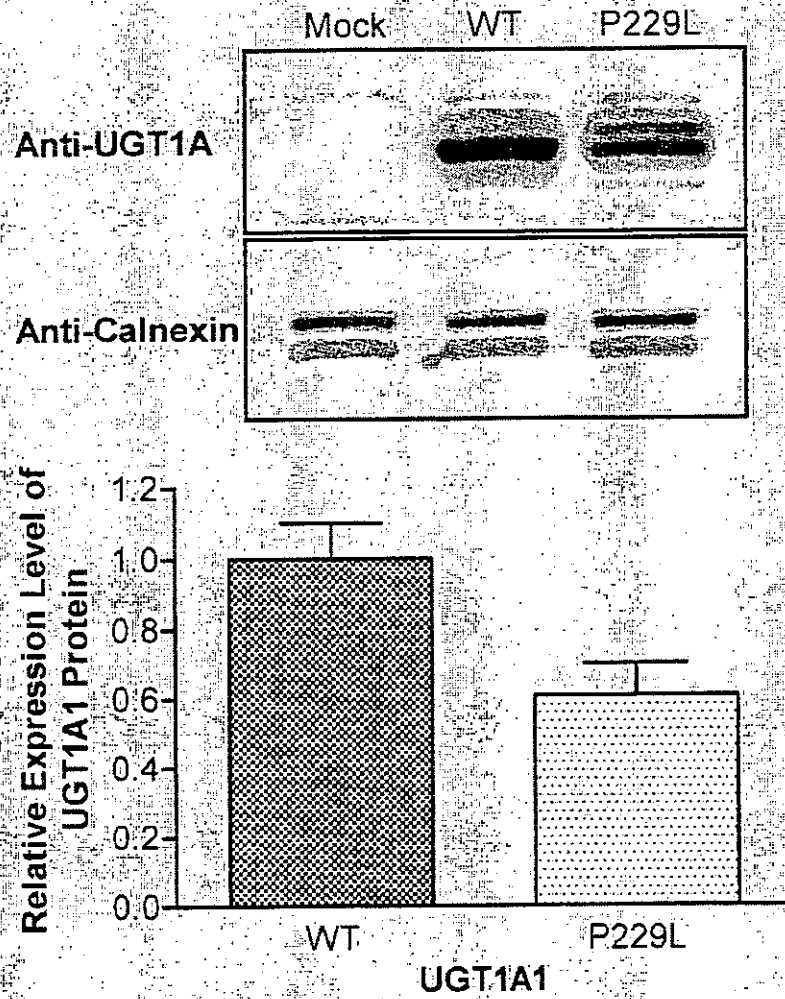


Fig. 3 Expression of WT and variant (P229Q) human UGT1A1s in COS-1 cells.
 (Upper) Patterns of Western Blotting
 (Lower) Relative expression levels of UGT1A1 proteins.

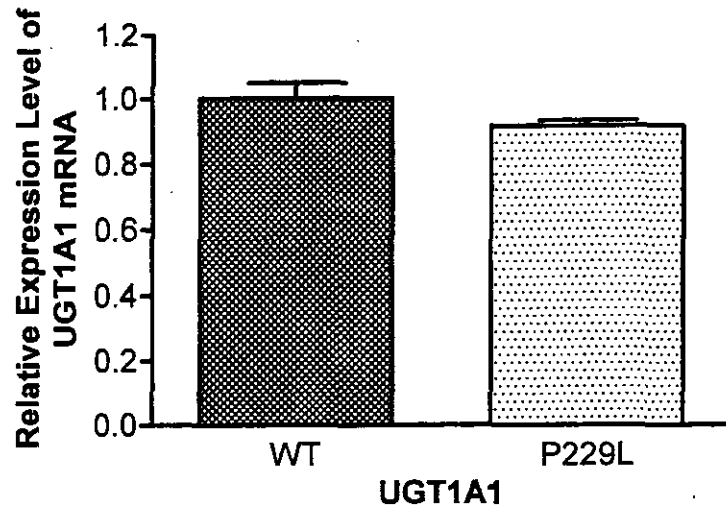


Fig. 4 Quantification of UGT1A1 mRNA by real-time SYBR Green RT-PCR in COS-1 cells transfected with WT and P229L clones.

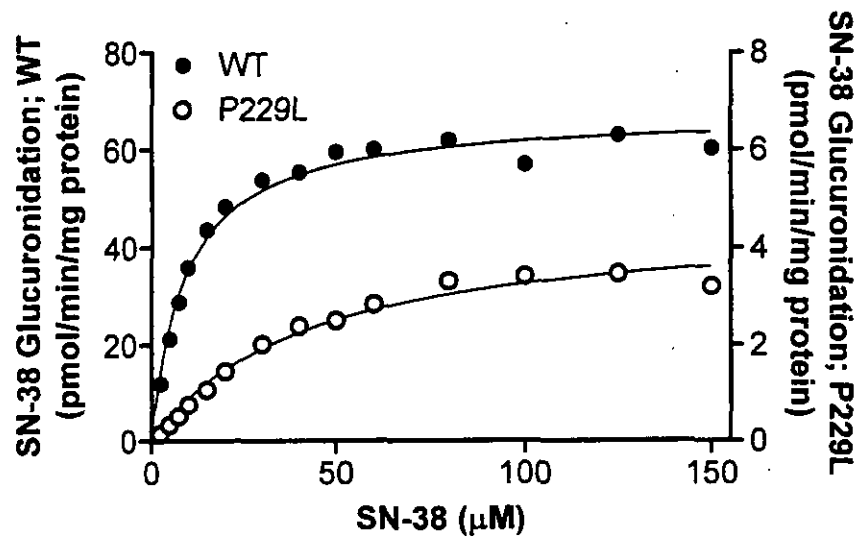


Fig. 5 Representative Michaelis-Menten kinetics of SN-38 glucuronidation by expressed WT (solid circle) and P229L (open circle) human UGT1A1s.

Table 6 Kinetic parameters of SN-38 glucuronidation by Wild-type and P229L UGT1A1s

UGT1A1	K _m (µM)	V _{max} (pmol/min/mg protein)	V _{max} /K _m (µL/min/mg protein)	Normalized V _{max} (pmol/min/mg protein)	Normalized V _{max} /K _m (µL/min/mg protein)
Wild-type	8.67 ± 0.18	71.2 ± 4.73	8.23 ± 0.65	71.7 ± 2.46	8.26 ± 0.15
P229L	37.6 ± 2.34	5.27 ± 0.32	0.14 ± 0.02	8.93 ± 0.98	0.24 ± 0.03

Table 2 Reagent mixtures used in preparation of plasmid of UGT1A1-WT and -P229L

a) Reagent mixtures for the first PCR of UGT1A1-WT

Sterilized Water	39 μ L
10xPfx Amplification Buffer	5 μ L
MgSO ₄ (50 μ M)	1 μ L
dNTP Mix (10 μ M each)	1.5 μ L
20 μ M attB1_UGT1A1_F	1 μ L
20 μ M attB2_UGT1A1_F	1 μ L
pDNA/UGT1A1-WT	1 μ L
PLATINUM Pfx (2.5 U/ μ L)	0.5 μ L

b) Reagent mixtures for the second PCR of UGT1A1-WT

Sterilized Water	29 μ L
10xPfx Amplification Buffer	4 μ L
MgSO ₄ (50 μ M)	1 μ L
dNTP Mix (10 μ M each)	1.5 μ L
20 μ M attB1_Adapter_Primer	2 μ L
20 μ M attB2_Adapter_Primer	2 μ L
PLATINUM Pfx (2.5 U/ μ L)	0.5 μ L
1 st PCR Mixture	10 μ L

c) Reagent mixtures for cloning the UGT1A1 fragment in pDONR 201 Vector

TE	6 μ L
5xBP Reaction Buffer	4 μ L
attB UGT1A1 Fragment	4 μ L
pDONR201 Vector (150 ng./mL)	2 μ L
BP Clonase Enzymes Mix	4 μ L

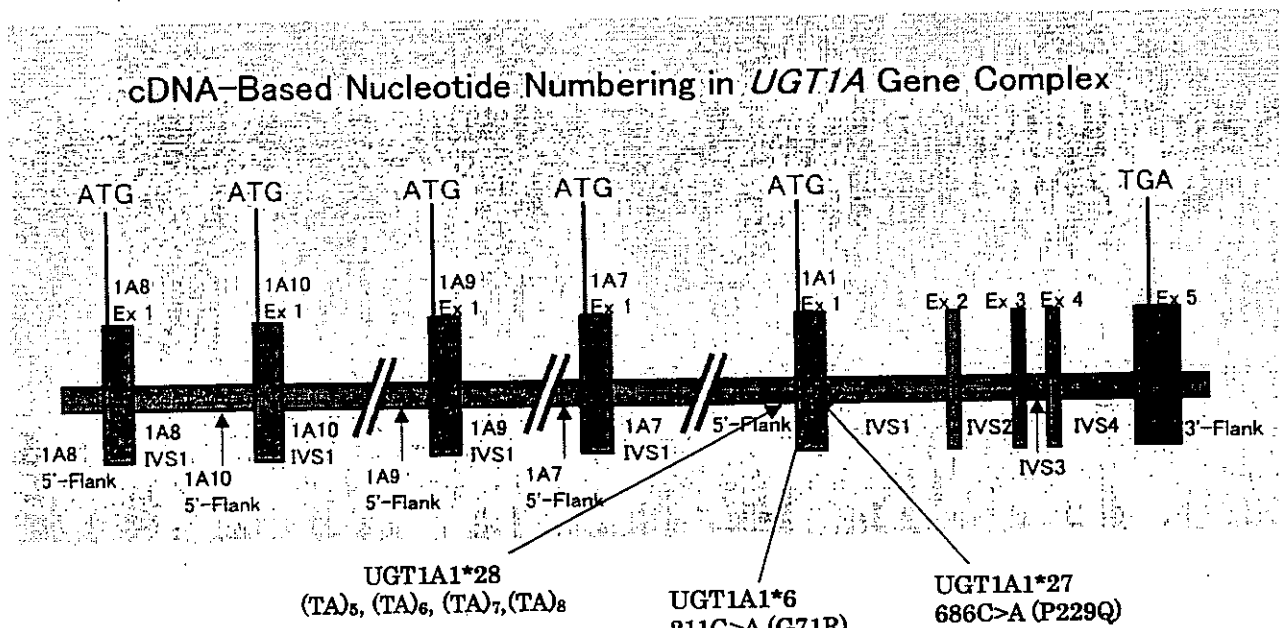


Fig. 1 A schematic structure of *UGT1A*s

Table 3 Allele frequencies of UGT1A1*28 among three different ethnic groups

Group Type	Ethnic	Caucasian* ¹	African-American* ²	Japanese* ³
(TA) ₅		0.017 (0.002,0.032)	0.044 (0.021,0.067)	0.000
(TA) ₆		0.588 (0.532,0.644)	0.446 (0.390,0.502)	0.903 (0.870,0.936)
(TA) ₇		0.388 (0.332,0.444)	0.446 (0.390,0.502)	0.097 (0.064,0.130)
(TA) ₈		0.007 (0.000,0.017)	0.064 (0.000,0.092)	0.000

Values in parentheses are 95 % confidence limits.

*¹ The number of chromosomes=294, *² the number of chromosomes =298, and *³ the number of chromosomes =300.

Table 4 Allele frequencies of UGT1A1*6 among three different ethnic groups

Group Type	Ethnic	Caucasian* ¹	African-American* ¹	Japanese* ¹
Wild		0.993 (0.984,1.000)	1.000	0.843 (0.802,0.884)
Variant		0.007 (0.000,0.016)	0.000	0.157 (0.116,0.198)

Values in parentheses are 95 % confidence limits.

*¹ The number of chromosomes =300.

Table 5 Allele frequencies of UGT1A1*27 among three different ethnic groups

Group Ethnic Type	Caucasian* ¹	African-American* ²	Japanese* ¹
Wild	1.000	0.997 (0.991,1.000)	0.997 (0.991,1.000)
Variant (C→A)	0.000	0.000	0.003 (0.000,0.009)
Variant (C→T)	0.000	0.003 (0.000,0.009)	0.000

Values in parentheses are 95 % confidence limits.

*¹ The number of chromosomes =300, and *² the number of chromosomes =298.

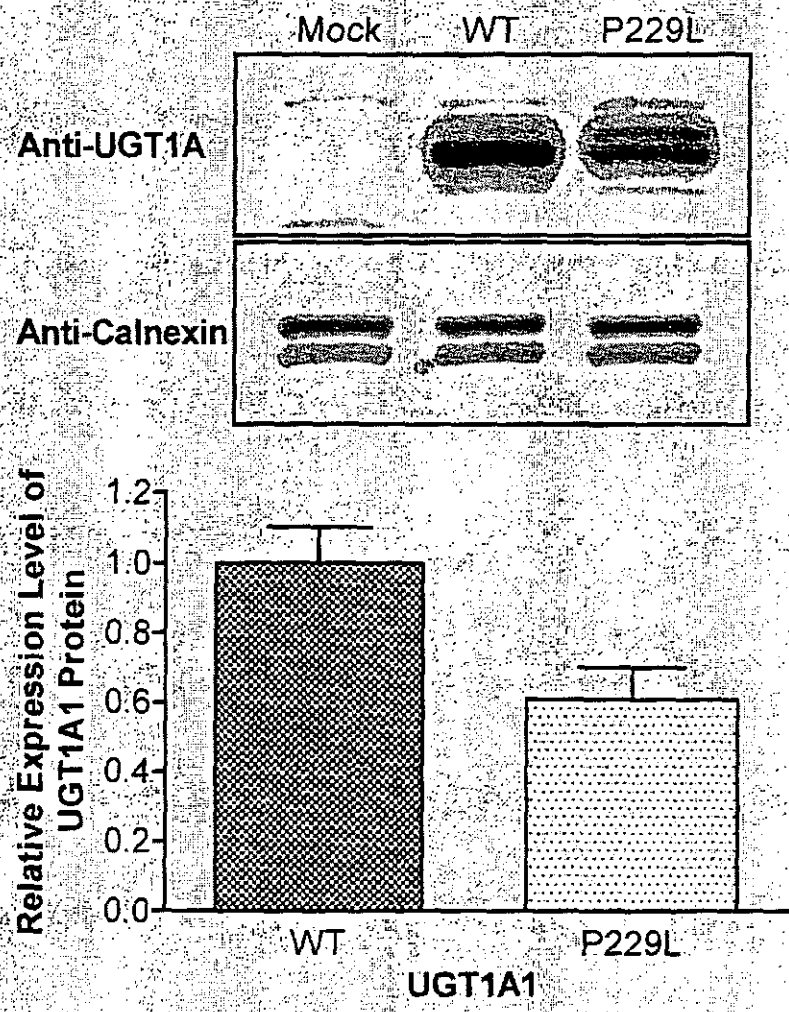


Fig. 3 Expression of WT and variant (P229Q) human UGT1A1s in COS-1 cells.
 (Upper) Patterns of Western Blotting
 (Lower) Relative expression levels of UGT1A1 proteins.

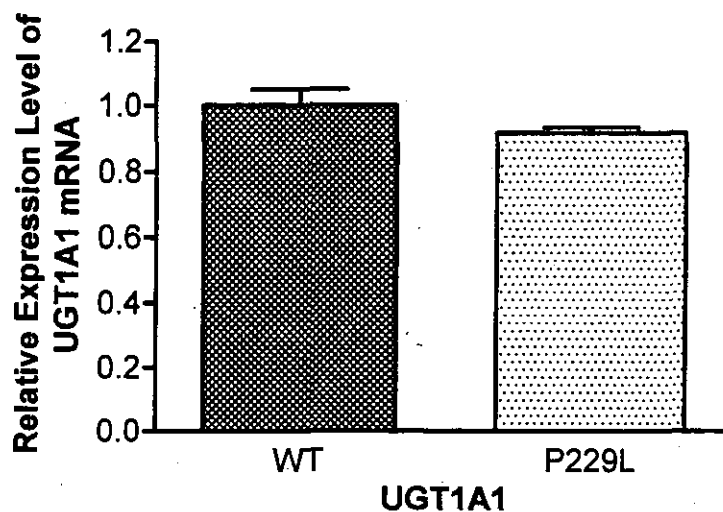


Fig. 4 Quantification of UGT1A1 mRNA by real-time SYBR Green RT-PCR in COS-1 cells transfected with WT and P229L clones.

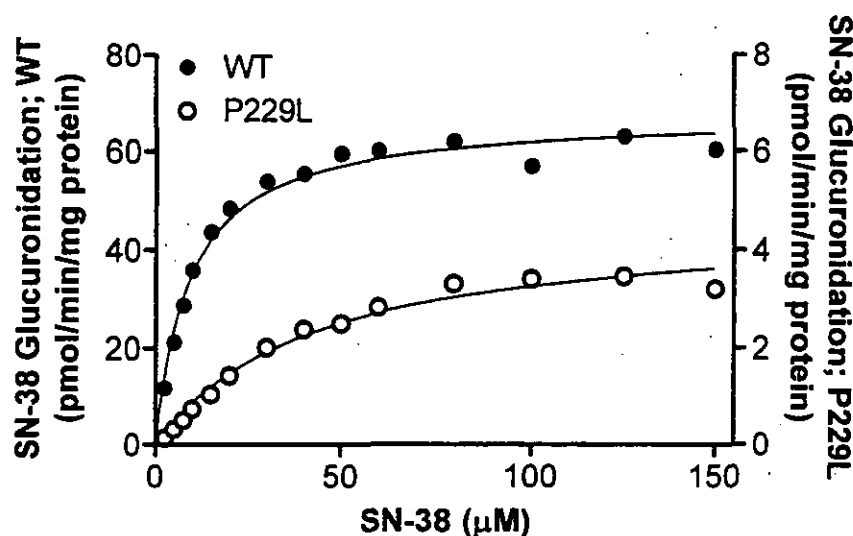


Fig. 5 Representative Michaelis-Menten kinetics of SN-38 glucuronidation by expressed WT (solid circle) and P229L (open circle) human UGT1A1s.

Table6 Kinetic parameters of SN-38 glucuronidation by Wild-type and P229L UGT1A1s

UGT1A1	K_m (μM)	V_{max} (pmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	Normalized V_{max} (pmol/min/mg protein)	Normalized V_{max}/K_m ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein)
Wild-type	8.67 ± 0.18	71.2 ± 4.73	8.23 ± 0.65	71.7 ± 2.46	8.26 ± 0.15
P229L	37.6 ± 2.34	5.27 ± 0.32	0.14 ± 0.02	8.93 ± 0.98	0.24 ± 0.03

分担研究報告書

分担研究者 千葉 寛 千葉大学大学院教授

研究要旨

前年度、*CYP3A4*1B* の頻度解析により、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したゲノム DNA を用い、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、人種間での変異発現頻度の比較を行った。また、昨年度分担研究者である家入が頻度到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、発現頻度到人種差は見られなかった。一方、*CYP3A4*6* については、白人種、黒人種では解析した全てのサンプルにおいて野生型であったのに対し、日本人のサンプルでは1検体ヘテロ型として *CYP3A4*6* 変異が検出された。その発現頻度は 0.34% であった。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。*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。そのため、*OATP-C*5* と *OATP-C*15* を足した頻度で考えた場合、日本人は白人種の約二倍、黒人種の約 10 倍の頻度でこれらの遺伝子が発現していることから、これらの変異に起因する機能低下者の頻度が日本人では高く *OATP-C* の平均的な機能は低い可能性が示唆された。

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* 遺伝子に関する変異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、人種間で比較することを目的とした。初年度は、*CYP3A4* 遺伝子の 5'-上流の変異である *CYP3A4*1B* の発現頻度を解析することにより、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した。そこで、本年度は、機能低下に関わるとされる変異

のうち *CYP3A4*2*, *CYP3A4*5*, *CYP3A4*6* について解析し、人種間での変異発現頻度の比較を行った。さらに、*CYP3A4*4*, *CYP3A4*8* の解析について、迅速な解析法である denaturing HPLC 法による DNA フラグメント解析法を確立した。

一方、昨年度分担研究者である家入は肝に特異的に発現しているトランスポーターである *OATP-C* の変異遺伝子 (*OATP-C*5* と *OATP-C*15*) の発現頻度到人種差が存在することを明らかにした。即ち、*5 は白人種のみで認められ (15%)、*15 は日本人で高く (15%)、ついで白人種 (5.6%)、黒人種 (1.4%) の順である。*15 は *in vivo* で、*5 は *in vitro* で機能の低下が報告されているが、同じ系での比較は行われていない。本研究ではこれらの変異遺伝子を HEK293 細胞に導入発現させ機能への影響を *in vitro* で比較した。

B. 研究方法

*CYP3A4*2*と*CYP3A4*5*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産物をそれぞれ*StyI*あるいは*Clal*で制限酵素処理することにより変異の有無を調べた。*CYP3A4*6*については、PCR-RFLP法とdenaturing HPLC法を組み合わせたDNAフラグメント解析法により解析した。すなわち、野生型では*HinfI*により切断されないため、denaturing HPLC法によりクロマトグラフ上で単一ピークとして検出されるのに対し、*CYP3A4*6*変異型では、二つのピークとして検出されることに基づいて判定した。

*CYP3A4*4*および*CYP3A4*8*については、野生型ゲノムDNAを鋳型とし、exon 5を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。これらベクターを用い、WAVE systemを用いたdenaturing HPLC法による変異解析法を確立した。

(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*2*および*CYP3A4*5*に関しては、解析した白人種(150人)、黒人種(150人)、日本人(149人)すべてにおいて変異は検出されなかった。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。

*CYP3A4*4*および*CYP3A4*8*に関するdenaturing HPLC法による変異解析は、野生型のみでの測定サンプルではシングルピークを示すのに対し、野生型と変異型を混合した測定サンプルではヘテロデュプレックスの形成が見られ溶出ピークは2本に分かれ、溶出ピークパターンの違いによる未知サンプルの遺伝子型判定方法を確立した。

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。

D. 考察

*CYP3A4*2*および*CYP3A4*5*に関しては、検討したいずれの人種においても変異が検出されなかったことから、変異遺伝子の発現頻度は非常に低く、人種差を説明する因子とは言い難いことが示唆された。一方、*CYP3A4*6*に関しては、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。そのため、今回の結果から*OATP-C*5*と*OATP-C*15*を足した頻度で考えた場合、日本人は白人種の約二倍、黒人種の約10倍の頻度でこれらの遺伝子が発現していることから、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