

200400186A

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

「テーラーメイド医療用全自動DNAチップ診断機器の開発」
に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 源間 信弘

平成 17年 4月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

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

「テーラーメイド医療用全自動DNAチップ診断機器の開発」
に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 源間 信弘

平成 17年 4月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告

テーラーメイド医療用全自動DNAチップ診断機器の開発に関する研究	1
源間信弘	

II. 分担研究報告

1. テーラーメイド医療用DNAチップおよび全自動診断機器の開発 に関する研究	4
源間信弘	
2. 薬物動態予測用DNAチップの開発に関する研究	9
東 純一	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	15
-----------------	----

総括研究報告書

「テーラーメイド医療用全自動 DNA チップ診断機器の開発に関する研究」

主任研究者 源間 信弘 （株）東芝 研究開発センター 事業開発室グループ 技監

研究要旨：我々は、テーラーメイド医療の実践を加速するために、電気化学的な DNA 検出技術に基づく、迅速、安価、高信頼性の DNA チップおよび全自動 DNA チップ診断機器を目指している。本研究では、全自動診断機器の主要機構を試作しその機能検証を行った。また、検出の高感度化を目的に、電気信号を増幅する回路を同一チップ上に一体集積した CMOS デバイス集積型 DNA チップを検討した。更に、代表的な薬物代謝酵素「NAT2、CYP2C19、CYP2D6」の遺伝子多型を解析する薬物動態予測用 DNA チップを開発し、臨床検体を使って実用性を検証した。

分担研究者：

東 純一

大阪大学大学院薬学研究科 教授

A. 研究目的

医薬品の有効性や副作用発現の個体差を予測するために、薬物代謝酵素や薬物標的分子の遺伝子多型の判定や、特定の遺伝子発現量の変動解析に関するデータが蓄積されつつあり、テーラーメイド医療に対する期待が高まって来ている。このような状況下、2005年3月にFDAから、Guidance for industry "Pharmacogenomic Data Submissions"が公表され、医薬品開発時および市販後臨床試験内での検討が本格的に行われ始めた。本邦でも2005年3月に厚労省から“医薬品の臨床試験におけるファーマコゲノミクスの利用指針の作成に係る行政機関への情報の提供等について”が通知されるなど、テーラーメイド医療に向けての整備が進み始めている。一方で、臨床応用に向けての研究が概して膨大な時間と経費を要する点、既存の遺伝子解析機器は非常に高価で、尚且つその操作には高い専門性が必要なため、一般の医療現場で使うにはハードルが高い点など、テーラーメイド医療を支えるハード面での対応は必ずしも充分とは言えない。

本研究は、テーラーメイド医療の実践を加速するために、主任研究者らがこれまで開発してきた電気化学的な DNA 検出技術および全自動 DNA 検査プロセスを基にして、迅速、安価、高信頼性の医療用 DNA チップと全自動 DNA チップ診断機器を開発し、その機能を検証することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 全自動 DNA チップ診断機器の開発

主任研究者らは現在主流の蛍光方式に替わる新しい DNA 解析技術として、1990年より電流検出方式を開発してきた。電流検出方式は、標識色素や光学検出系を必要としない為、チップ、システム共に低コスト化が可能である。また、煩雑な色素標識が不要なため検査時間が短くて済む。更に、検出系がコンパクトなので、システムの小型化が容易であるなど、蛍光方式での問題点を克服可能と考えられている。すなわち、より信頼性・実用性の高いシステムを構築できる可能性がある。

また、DNA 解析技術の開発と並行して、DNA 検査の完全全自動化に関する研究も進めており、これまでに完全密閉型の小型カセットを用いる検査プロセスを検証してきた。

本研究ではこれらの技術を融合させることで、一般病院レベルでも使用可能な、実用性の高い全自動 DNA チップ診断機器を目指し開発を行った。

(2) 薬物動態予測用 DNA チップの開発

全自動 DNA チップ診断機器で測定する検査項目として、代表的な薬物代謝酵素 3 種類（N-acetyl-transferase-2 (NAT2)、CYP2C19、CYP2D6）の遺伝子多型を解析するための電流検出型 DNA チップを開発し、その実用性を臨床検体を使い評価した。NAT2 は抗結核薬であるイソニアジドを代謝する酵素として知られている。また CYP2C19 はプロトンポンプ阻害剤（消化器薬）、

CYP2D6はβブロッカーなどを代謝する酵素として知られている。これらは何れも遺伝子型と酵素活性および薬物血中濃度などの関係が詳細に解析されており、テーラーメイド医療を実現するための検査項目として、その有用性は非常に高いと考えている。

また、電気信号を増幅する回路を同一チップ上に一体集積したCMOSデバイス集積型DNAチップを試作し高感度化に向けた機能の検証を行った。

更に、新たな検査項目の開発に向けて、臨床研究で候補遺伝子の探索を行い、DNAチップ化に有望な遺伝子および多型部位の絞込みを行った。

(倫理面への配慮)

本研究への参加ボランティアに対しては、インフォームド・コンセントを文書で行う。また、遺伝子解析を含む臨床研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)」に従い、実施施設内または然るべき機関に所属する倫理委員会において研究計画の承認を受けるものとする。

C. 研究成果

(1) 全自動DNAチップ診断機器の開発

完全密閉型カセットを基本構成とする、全自動DNAチップ診断機器の主要機構の試作および機能検証を中心に検討した。まず、DNA増幅プロセスに関しては、カセットの材質や形状と増幅効率との関係が明らかになり、全自動DNAチップ診断機器で用いる使い捨てカセットの仕様をほぼ決定することができた。更に送液などの主要機構の機能検証を完了させ、これを基に実用型全自動DNAチップ診断機器のプロトタイプ機の詳細設計を開始した。

また、密閉型カセットを用いる全自動化装置では、カセット内に予め封入しておく試薬の保存方法も重要な検討課題であるが、今回、酵素、電解質、挿入剤、DNAチップなどの長期保存安定性にも目処をつけることができた。

更に、チップ上に形成された電極の保護膜材質および構造を変更することで検出の安定性を向上させると共に、電気信号を増幅する回路を同一チップ上に一体集積したCMOSデバイス集積型DNAチップを試作し、DNAの検出が可能であることを検証した。

(2) 薬物動態予測用DNAチップの開発

NAT2解析チップとしては、日本人で頻度の高いalleleである*4(wild type)、*5、*6、*7を検出するた

めに、3箇所の一塩基多型(481C/T、590G/A、857G/A)を同時に検出できる電流検出型DNAチップを作製した。

CYP2C19解析チップとしては、日本人で頻度の高いalleleである*1(wild type)、*2、*3を検出するために、2箇所の一塩基多型(636G/A、681G/A)を同時に検出できる電流検出型DNAチップを作製した。

CYP2D6解析チップとしては、日本人で頻度の高いalleleである*1、*2、*4、*5、*10、*14、*18、*21、*36、*41を検出するために4箇所の一塩基多型(11846A/G、1934A/G、2938G/A、4268G/C)と2D6遺伝子の欠損を同一基板上で同時に検出できる電流検出型DNAチップを作製した。

上記3種類の薬物動態予測用DNAチップの実用性を臨床検体を使って評価した結果、全て従来法(PCR-RFLP、TaqManPCRなど)による解析結果と一致していた。

また、臨床検体を使った解析の結果、抗うつ剤等の代謝に関与している5HTT、5HT1AR、5HT2ARなどの遺伝子多型解析が新規検査項目として有用であることが明らかになった。

D. 考察

全自動DNAチップ診断機器の開発では、機能検証が終了し、最終的な装置仕様を決定することができた。

薬物動態予測用DNAチップの開発では、臨床検体を使った評価で実用性を検証することができた。特に、従来CYP2D6の遺伝子欠損は検出が難しいとされていたが、今回DNAチップで簡便に解析できるようになった意義は大きいと考えられる。

今後、臨床診断機器としての信頼性向上に向けて、更に多数の臨床検体を使った評価を行うと共に、検出条件、判定アルゴリズムの最適化を進める。

E. 結論

初年度の目標は、ほぼ計画通りに達成することができた。次年度は、全自動DNAチップ診断機器の詳細設計、試作を中心に行うと共に、新たに3項目程度の新規検査に対応したDNAチップを開発し、その実用性を検証する予定である。

F. 健康危険情報—特になし

G. 研究発表

1. 論文発表—(省略)
2. 学会発表—(省略)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許（出願）

- ・特願 2004-199368 「核酸検出装置及び核酸検出方法」
- ・特願 2004 300267 「核酸検出センサ、核酸検出チップ及び核酸検出装置」
- ・特願 2005-078977 「塩基配列判定方法、塩基配列判定システム及び塩基配列判定プログラム」
- ・特願 2005-83685 「生体分子の定量分析チップ、及び、定量分析方法、定量分析装置及びシステム」

2. 実用新案---なし

3. その他---なし

分担研究報告書

「テーラーメイド医療用 DNA チップおよび全自動診断機器の開発に関する研究」

主任研究者 源間 信弘 東芝 研究開発センター 事業開発室グループ 技監

研究要旨：本研究では、完全密閉型カセットを用いる全自動診断機器の主要機構の試作および機能検証を中心に検討した。その結果、使い捨てとなるカセットの材質や形状等の仕様、更には送液等の主要機構の機能を検証できた。また、電気信号を増幅する回路を同一チップ上に一体集積した CMOS デバイス集積型 DNA チップを試作し、検出の高感度化にも目処をつけることができた。更に、代表的な薬物代謝酵素「NAT2、CYP2C19、CYP2D6」の遺伝子多型を解析するための DNA チップを開発した。

A. 研究目的

本研究では、テーラーメイド医療の実践を加速するために、簡便、迅速、安価、高信頼性の医療用 DNA チップおよび全自動 DNA チップ診断機器の開発を目的とした。

B. 研究方法

(1) 電流検出方式の DNA チップ技術

蛍光方式に替わる新しい DNA 検出技術として、主任研究者らは 1990 年から電流検出型の DNA チップの開発を行っている。

電流検出型の DNA チップは、DNA プローブが結合した金電極上で検体 DNA とハイブリダイゼーション反応を行い、形成したハイブリッド（二本鎖）部位に特異的に結合する挿入剤という分子を添加し、電圧印加による挿入剤の酸化還元電流を検出する、という原理である（図 1）。この方式は、標識色素や光学検出系を必要としない為、チップ、システム共に低コスト化が可能である。また、煩雑な色素標識が不要なため検査時間が短くて済む。更に、検出系がコンパクトなので、システムの小型化が容易であるなど、蛍光方式での問題点を克服可能と考えられている。すなわち、より信頼性・実用性の高いシステムを構築できる可能性がある。

そこで本研究では、電流検出型 DNA チップを使った全自動診断機器および薬物動態予測用 DNA チップの開発を行った。

(2) 全自動 DNA チップ診断機器の開発

主任研究者らは、これまでに完全密閉型カセットを用いる全自動 DNA 検査プロセスの原理

を検証してきた。そこで、本研究ではこの検査プロセスを具体化すること、すなわち全自動 DNA チップ診断機器の開発を目的に、主要機構の試作および機能検証を中心に検討した。また、検出の高感度化を目指して、電気信号を増幅する回路を同一チップ上に一体集積した CMOS デバイス集積型 DNA チップについても検討を行った。

(3) 薬物動態予測用 DNA チップの開発

薬物動態予測用 DNA チップとして、代表的な薬物代謝酵素である N-acetyl-transferase-2 (NAT2)、CYP2C19、CYP2D6 の遺伝子多型を解析するための電流検出型 DNA チップを開発した。

DNA チップの基板材料には、金電極がパターンニングされたガラスを使用した。基板には作用電極が 40 個（直径 200 μ m）と、参照極、対極が形成されている。プローブには、末端をチオール化した合成 DNA を用いた。チオール基と金は非常に親和性が高いため、電極表面にプローブ溶液を滴下するだけで簡単に固定化できる。また、固定化プロセスでは Cartesian 社製の DNA 溶液微量分注装置を使用して、DNA プローブ溶液を作用電極上にスポッティングした。

解析サンプルとしては、血液から抽出したゲノム DNA を鋳型にして、遺伝子多型を含む領域を PCR 増幅した断片を使用した。

測定には、DNA チップ自動検査装置 GLH-2C301（試作機）、あるいは市販の電気化学測定装置を用いて行った。前者は、ハイブリダイゼーション反応からデータ解析までのプロ

セスを自動化しており、遺伝子増幅産物を DNA チップカセットに注入後、装置にセットするだけで DNA の解析が行える。

(倫理面への配慮)

本研究への参加ボランティアに対しては、インフォームド・コンセントを書面で行う。臨床材料を使った研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、実施施設内または然るべき機関に所属する倫理委員会（含、東芝・研究開発センター倫理審査委員会）において研究計画の承認を受けるものとする。また、臨床材料提供者の個人情報が出漏らないよう、全て匿名化を行う。

C. 研究成果

(1) 全自動 DNA チップ診断機器の開発

全自動診断機器開発に関しては、本年度は、低コスト化を実現可能なカセット全体構成の概念設計、その中で特に送液機構の要素実験、安定的な反応（特に増幅工程）を実現可能な装置構成部品材料検討、試薬保存性に関する基礎的な検討を行った。

カセット全体構成に関しては、手のひらに乗るサイズのカセットを4種類考案した。いずれも、サンプルとしては、血液を想定しており、サンプル注入口に血液を一滴注入し、蓋を閉めることで完全に密閉する構成となっている。反応チャンバは、基本的に、試薬を混合するためのミキシングチャンバと、増幅等の反応をするための反応チャンバを備えている。また、各反応で使用する試薬類もすべてカセット内に内蔵されている構成となっている。さらに、試薬等を移動させるための送液機構（ポンプ機構）もすべてカセット内に内蔵されている構成となっている。従って、一旦サンプルをカセット内に注入した後は、外部とは完全に遮断されており、全自動検査装置において最も懸念される、サンプルのコンタミネーションを起こす可能性が極めて低い構造となっている。

考案した4種類のカセット構成は、試薬等の送液方法が異なっている。3種類は、循環型の構成となっており、1種類は直線型の構成となっている。循環型タイプについては、送液方法が、チューブポンプを模したタイプ、シリンジポンプを模したタイプ、ローラポンプを模したタイプの3種類に関して、機能検証を行った。これらは、基本的には送液機構は一つで、複数のバルブによって送液したい試薬を選択すると

いう構成となっている。ローラポンプタイプについては、必要と考えている一回の送液量を確保するためには、かなり大型のポンプ領域が必要になることが分かったため、小型カセットとは必ずしも相容れない構成であることが判明した。また、シリンジポンプタイプに関して、要素試験機を試作し、試験した結果、送液に関しては問題なく動作することは確認できたものの、加圧試験を行ったところ、必要な耐圧を満足させるためには、部品の加工・組立てに関して高度な精度が要求されることが分かった。従って、簡便なカセットにおいて実現するのは難しい、という判断を行った。循環型構成では、チューブポンプを模した形式のカセットが候補として残っている。

次に、直線型構成においては、各試薬に対して送液機構が具備されている構成となっている。従って、送液する試薬の選択は、バルブによる流路選択ではなく、送液したい試薬に付随する送液機構を動作させることにより行うことが特徴である。この構成に対して、要素試験機を試作し、試験した結果、送液が問題なく行われることを確認した。また、送液機構を選択することにより、所望の試薬を所望の流路に沿って送液出来ることも確認した。

従って、カセット全体構成案としては、2案を候補構成として今後も検討を続ける。

引き続き、装置構成部品材料と反応効率との関連性について調べた。構成部品の断片を市販のPCRチューブに浸漬した状態で、PCR増幅反応をし、電気泳動によって増幅の可否・増幅量について実験を行った。その結果、PCR酵素によって、部材による増幅への影響度合いが異なることが分かった。また増幅領域部品に関しては、表面粗さが増幅に影響を及ぼしている可能性を示唆する実験結果が得られており、今後の装置試作の要求加工精度に対する指針を得ることが出来た。更には、試薬保管部の材料、流路形成部品材料に関して、試薬の吸着等による反応効率低下の有無の検証実験を行い、装置構成に使用可能な材料の選定も行った。

本提案では、試薬もカセット内に内蔵されている構成となるため、内蔵された状態での試薬保管性についても検討する必要がある。そこで、DNA抽出・PCR増幅・DNAチップ反応に必要な試薬を凍結保存し、解凍後反応に変化があるかどうかを実験した。その結果、保存する試薬の組合せや組成によって、保存性に影響が現れることが明らかになった。従って、カセットを

製作するに当たっては、試薬保管方法も十分に考慮した設計が必要になってくる。

次年度以降は、今年度の要素実験結果を基に、装置詳細設計を行い、機能検証機の試作を行う予定である。

また、検出の高感度化を目指している CMOS 半導体回路を内蔵した DNA チップの開発も併せて行った。既に CMOS センサの基本動作は確認しており、今回は高感度な定量分析を可能にする、より微小なセンサを作製し、DNA の検出を検討した。微小化に当たっては、これまでとは回路動作条件が大きく異なることから、それを考慮した回路設計を行い、センサ回路一体集積型 DNA チップを試作した。この結果、直径 200、63、20 μ m のセンサで DNA の検出が可能であることが確認された。

更なるセンサの微細化とこれらを用いた定量分析性能の検証については、来年度引き続き実施していく。

(2) 薬物動態予測用 DNA チップの評価および検証

NAT2 チップでは 481C/T、590G/A、857G/A の 3 箇所の 1 塩基遺伝子多型 (SNP) 部位を対象にした。選択した SNPs は全て 2 塩基置換タイプであることから、DNA チップ上には SNP 当たりそれぞれのアレルに対応する 2 種類のプローブを固定化した。今回使用したチップでは、データの信頼性を確保するために 1 種類のプローブに付き 4 電極以上を割り当てた。また、チップに反応させるターゲットとして NAT2 の SNPs を含む 2 断片のマルチ PCR 増幅の条件を決定した。

CYP2C19 チップでは 636G/A、681G/A の 2 箇所の SNPs を対象にした。DNA チップ上には NAT2 と同様に、SNP 当たりそれぞれのアレルに対応する 2 種類のプローブを固定化すると共に、チップに反応させるターゲットとして 2 断片のマルチ PCR 増幅の条件を決定した。

CYP2D6 チップでは 1846A/G、1934A/G、2938G/A、4268G/C の 4 箇所の SNPs と遺伝子の欠損を対象にした。SNPs の場合は前記チップと同様に、SNP 当たりそれぞれのアレルに対応する 2 種類のプローブを固定化した。また、遺伝子の欠損 (*5) を検出する場合は、CYP2D6 遺伝子の有無に特徴的な増幅断片と反応する 2 種類のプローブを固定化した。チップに反応させるターゲットとしては SNPs 用の 3 断片のマルチ PCR 増幅の条件、および、遺伝子欠損を

検出するための 2 断片 (long PCR) の条件を決定した。

上記 3 種類の薬物動態予測用 DNA チップの特性を、臨床検体のモデル形として合成 DNA あるいは Coriel Cell Repository から購入した市販ゲノムを用いて評価した。その結果、全ての遺伝子型に特異的な検出が検証できた。また、同一基板内での再現性を評価したところ、CV 値で 5%以下と良好な結果が得られた。ここで開発した DNA チップの実用性評価は、分担研究者である大阪大学大学院薬学研究科において行われた。

D. 考察

全自動 DNA チップ診断機器の開発では機能検証が終了し、最終的な装置仕様を決定することができた。また、COS 型センサについても、高感度化の条件となる微細化にも目処をつけることができた。

薬物動態予測用 DNA チップの開発では、市販ゲノムを使ったモデル系で良好な特性を検証することができた。従来 CYP2D6 の遺伝子欠損は検出が難しいとされていたが、今回 DNA チップで簡便に解析できるようになった意義は大きい。

E. 結論

初年度の目標をほぼ計画通り達成することができた。次年度は全自動 DNA チップ診断機器の詳細設計、試作を中心に行うと共に、新たに 3 項目程度の新規 DNA チップを開発する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表---なし

2. 学会発表

2004 International Meeting of the Institute of Human Virology (Oct 31-Nov 4 2004) M Takahashi, K Hashimoto, N Gemma, K Johnson, S Heyward, M Andersson, D Oldach. Rapid and Efficient Electrochemical Detection of MxA and Mannose Binding Lectin (MBL) SNPs (single nucleotide polymorphisms) in HCV (+) Patients utilizing the Toshiba Genalyzer™.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許（出願）

特願 2004-199368 「核酸検出装置及び核酸検出方法」源間信弘、大内真一、岡田純

特願 2004 300267 「核酸検出センサ、核酸検出チップ及び核酸検出装置」大内真一

特願 2005-078977 「塩基配列判定方法、塩基配列判定システム及び塩基配列判定プログラム」本郷禎人、弥永真司

特願 2005-083685 「生体分子の定量分析チップ、及び、定量分析方法、定量分析装置及びシステム」堀内秀紀、本郷禎人

2. 実用新案--なし

3. その他--なし

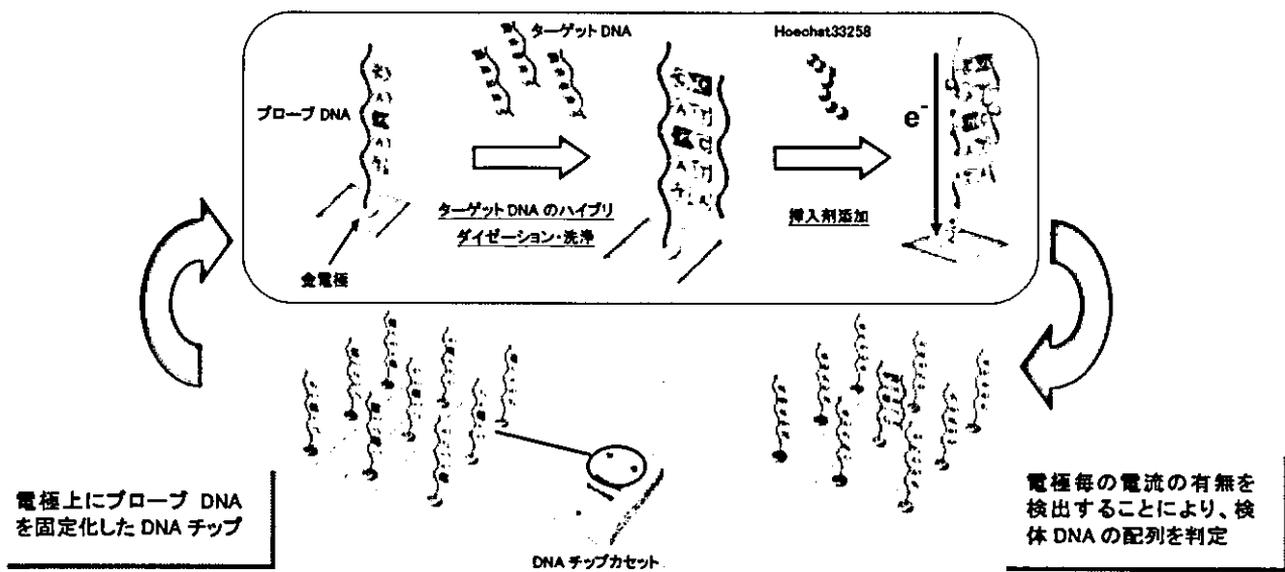


図 1 電流検出型 DNA チップの検出原理

分担研究報告書

「薬物動態予測用 DNA チップの開発に関する研究」

分担研究者 東 純一 大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学 教授

研究要旨： 本研究では、個別化適正医療の実践を加速させるため、簡便、迅速、安価、高信頼性の遺伝子多型判定用 DNA チップの開発を行う。今回は、遺伝子多型の影響が明確にされており、且つ、臨床的に有用な分子である、薬物代謝酵素 NAT2、CYP2C19、CYP2D6 判定用 DNA チップ（薬物動態予測用 DNA チップ）の仕様を検討し、実用性の評価・検証を行った。全ての遺伝子多型において、従来法による判定結果と DNA チップによる判定結果とが一致することを確認し、DNA チップの実用性が検証できた。また、DNA チップによる迅速な遺伝子型判定が期待される新規コンテンツに関する検討を進めた。

A. 研究目的

医薬品の有効性や有害作用発現の個人差を予測するためには、薬物代謝酵素や薬物標的分子の遺伝子多型の判定が有用であることを期待させるデータが蓄積されつつある。しかし現状では、薬効に関するゲノム情報が実地臨床の場で有効に利用されるに至っていない。一方、データの蓄積のみならず、蓄積されたデータの適正応用、すなわち遺伝子多型情報に基づいた個別化適正医療を実践する時機が来ていることに疑いの余地はない。本研究では、遺伝子多型情報に基づいた個別化適正医療の実践を加速させるため、簡便、迅速、安価、高信頼性の DNA チップおよび全自動 DNA チップ診断機器の開発を目的とする。

B. 研究方法

(1) 医療診断用 DNA チップの仕様の検討および新規候補遺伝子の探索

遺伝子多型の影響が明確にされており、且つ、臨床的に有用な分子として、薬物代謝酵素である NAT2、CYP2C19、CYP2D6 を選定し、薬物動態予測用 DNA チップの開発を行った。それぞれの分子において、DNA チップの仕様を決定するため、临床上重要な多型部位、すなわち個人の代謝酵素の活性を予測するために必要な多型を探索した。

また、新規コンテンツを有する DNA チップ開発を目的に、臨床研究の中で新たな開発候補遺伝子を探索した。

(2) 薬物動態予測用 DNA チップの評価・検証
分担研究者らは、上述の 3 つの遺伝子に存在する遺伝子多型の臨床的意義を検討した経験を有し、シーケンスによりに保証され、また臨床的利用が可能であった PCR-RFLP 法、Taq Man 法等の従来法による解析を確立している。今回、この従来法と新規に開発する DNA チップとのクロスバリデーションを実施し、主任研究者らが作製した DNA チップの精度および実用性の評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子多型解析を行うために、大阪大学ヒトゲノム倫理委員会及び DNA サンプル提供医療機関の倫理委員会の承認を得た。DNA サンプル採取のための採血を行う前に、被験者には当該試験の内容を十分に説明した後、文書による同意を得た。被験者から採取した血液検体は、採取医療機関にて匿名化し、大阪大学に届けられ、DNA が精製された。DNA サンプルは大阪大学にて厳重に管理されている。

C. 研究成果

(1) 医療診断用 DNA チップの仕様の検討および新規候補遺伝子の探索

・ NAT2 チップ

NAT2 遺伝子型は、これまでに NAT2*4~*19 が報告されている。しかし、日本人の NAT2 活性は、NAT2*5、*6、*7 の遺伝子多型を検出することでほぼ 100%説明できるとされている。そこで、この 3 種類の遺伝子型を検出するために、481C/T、590G/A、857G/A の 3 箇所の一塩基多型を解析対象とする DNA チップの開発を主任研究者らに提案した。

・ CYP2C19 チップ

CYP2C19 遺伝子型はこれまでに*1~*16 が報告されている。日本人における CYP2C19 低活性群は*2、*3 を検出することでほぼ 100%特定できるとされている。この 2 種類の遺伝子型を検出するために、636G/A、681G/A の 2 箇所の一塩基多型を解析対象とする DNA チップの開発を主任研究者らに提案した。

・ CYP2D6 チップ

CYP2D6 遺伝子型はこれまでに 50 種近くが報告されている。日本人における CYP2D6 遺伝子多型の頻度を検討し、CYP2D6*1、*2、*4、*5、*10、*14、*18、*21、*36、*41 が日本人に多いことを明らかにし報告している。また、これらの遺伝子型が CYP2D6 の活性に影響を及ぼすことも明らかにした。これらの遺伝子型を検出するために、代表的な 9 箇所の一塩基多型と 2D6 遺伝子の全欠損型を選択し、これらを判定する DNA チップの開発を主任研究者らに提案した。

・ 新規候補遺伝子の提案

CYP2C9 は、CYP2C19、CYP2D6 と同様に臨床的に重要な薬物代謝酵素である。CYP2C9 が代謝する薬物として、抗血栓薬ワルファリンや糖尿病薬トルブタミドなどが挙げられる。CYP2C9 の薬物代謝能の個人差が遺伝子多型により説明できると報告されており、CYP2C9 を今後新たに開発する DNA チップの候補とした。

UGT1A1 では日本人では UGT1A1*6、*27、*28、*29、*60 が観察されており、代謝活性を予測するために重要であるとされている。この活性は抗癌剤であるイリノテカンの代謝および副作用と関わるとの報告があり、判定を行う候補遺伝子として挙げた。

また、分担研究者らは、うつ病に対して薬物反応性に関わる臨床研究を行い、セロトニントランスポーター、セロトニン 1A、2A 受容体 (5HT1AR、5HT2AR) ならびに MDR1、CYP2D6 の遺伝子多型が重要であるという知見を得ている。これらの分子を「うつ病における個別化治療用 DNA チップ」として開発の候補に挙げた。

(2) 薬物動態予測用 DNA チップの評価・検証
主任研究者が開発した「Genelyzer」を分担研究者の研究機関に設置し、試作した DNA チップのクロスバリデーションを実施した。

・ NAT2 チップ

まず、少数の検体による評価と共に条件の調整を行い、盲検試験を含み約 100 例について NAT2 チップの評価を行った。すなわち 481C/T、590G/A、857G/A の 3 遺伝子多型の DNA チップを用いた判定を行い、全例において RFLP 法による解析と完全に一致した判定結果が得られた。

・ CYP2C19 チップ

日本人において観察される CYP2C19 遺伝子型は *CYP2C19**1/*1、*1/*2、*1/*3、*2/*2、*2/*3、*3/*3 の 6 種類が存在する。従来法である RFLP 法と TaqMan 法の 2 種の方法で事前に確認した 6 種の遺伝子型を含む DNA 試料を用いて、この遺伝子型の判定に必要な 636G/A、681G/A の 2 箇所の遺伝子多型を主任研究者が開発した DNA チップにより判定した。アルゴリズムの調整を行い、全例において従来法による解析と一致した判定結果が得られた。

・ CYP2D6 チップ

約 400 例のスクリーニングの結果から、独自にマイナーな多型を見出している。これを含む臨床検体を用いて、DNA チップによる CYP2D6 遺伝子型の判定を行った。提案した 9 箇所中で、特に重要な 4 箇所の多型部位を同時に検出する DNA チップの精度評価を行い、従来法で判定した結果と一致する結果を得た。また、CYP2D6 遺伝子の全欠損型の検出系においても従来法での判定結果と一致する結果が得られた。

D. 考察

(1) 医療診断用 DNA チップの仕様の検討および新規候補遺伝子の探索

遺伝子多型の頻度には人種差が存在することが知られている。このことより、先ず、日本人において有用性の高い DNA チップを作製するため、日本人に多く存在する遺伝子多型を選出し、DNA チップ開発の候補遺伝子多型として挙げた。次の段階として、日本人以外での本 DNA チップの適応を可能とするために、日本人以外の人種に多く見られる遺伝子多型を候補に挙げる必要がある。NAT2 においては、欧米人、黒人にアレル頻度約 5% で存在する *NAT**5C、*14B を検出するため、191G/A、341T/C の 2 種の遺伝子多型を判定する必要があり、今後、これらが判定可能な DNA チップ開発の提案、実用性の評価を行う。また、CYP2D6 については、活性予測の精度向上を目指し、残りの多型部位の検出が可能なチップの開発が必須である。

(2) 薬物動態予測用 DNA チップの評価・検証
NAT2、CYP2C19、CYP2D6 遺伝子多型検出用 DNA チップの実用性を、臨床検体を用いて評

価した。全例において、DNA チップによる判定結果が従来法による判定結果と一致することを確認した。特に、CYP2D6の全欠損の検出に関しては、直接DNA チップにより検出することは難しいとされてきたが、今回、PCR条件の最適化、プライマー位置の適正化などを行うことにより、精度良くCYP2D6の全欠損を検出できる条件を見出した。このことは、極めて意義深いことである。今後、さらに多数の臨床検体を用いた評価を行うことで実用性を検証し、判定結果の信頼性向上に向けて、検出条件、判定アルゴリズムの改良を行う。

E. 結論

当初の予定通り、薬物動態を予測するためのDNA チップをNAT2、CYP2C19、CYP2D6の3項目について考案し、臨床検体での実用性評価を実施した。条件の調整を行うことによりNAT2、CYP2C19、CYP2D6 チップと従来法での判定が一致することが確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

R. Kubota, M. Ohno, M. Yasunaga, S. Yokota, R. Maekura, J. Azuma Tentative treatments for tuberculosis based on N-acetyltransferase gene polymorphism. Jpn J Therapeutic Drug Monitoring (in press)

M Kato, Y Ikenaga, M Wakeno, G Okugawa, K Nobuhara, T Fukuda, K Fukuda, J Azuma and T Kinoshita,

Controlled clinical comparison of Paroxetine and Fluvoxamine considering the serotonin transporter promoter polymorphism Int. Clin. Psychopharmacol

2005 in press

Yuka Ikenaga, Tsuyoshi Fukuda, Kazuhiro Fukuda, Yuko Nishida, Masakazu Naohara, Hiromi Maune and Junichi Azuma

The frequency of candidate alleles for CYP2D6 genotyping in the Japanese population with an additional respect to the -1584C to G substitution Drug Metab. Pharmacokinet 2005 in press

福田剛史、東純一 ファーマコゲノミクス—テーラーメイド医療への道のり 薬物代謝酵素にかかわる個人差 医学のあゆみ vol209 No.6 351-356 2004

2. 学会発表

第19回日本薬物動態学会年会, 2004年11月17日~19日(金沢) MDR1遺伝子多型とSSRIの臨床効果の関連性(ABC1(MDR1) polymorphism might be related to clinical response to paroxetine, but fluvoxamine)

福田和大, 福田剛史, 池永有香, 加藤正樹, 分野正貴, 奥川学, 山下恵実, 延原健二, 木下利彦, 東純一

第25回日本臨床薬理学会年会, 2004年9月17日~18日(静岡) Rapid Acetylatorに対するイソニアジド増量試験 窪田竜二, 大野雅子, 古塚深雪, 中山哲, 田邊智子, 蓮沼智子, 飯島肇, 山田宏美, 武部雅人, 東純一

第25回日本臨床薬理学会年会, 2004年9月17日~18日(静岡) 抗うつ薬SSRIの臨床効果及び副作用発現に対するセロトニン受容体遺伝子多型の影響 福田和大, 福田剛史, 加藤正樹, 分野正貴, 池永有香, 山下恵実, 奥川学,

延原健二, 木下利彦, 東純一

第25回日本臨床薬理学会年会, 2004年9月17日
~18日 (静岡)

血清ビリルビン値に影響を及ぼすUGT1A1遺伝子多型の臨床的意義

田邊智子, 大野雅子, 松本京子, 安永実沙,
窪田竜二, 蓮沼智子, 飯島肇, 有沢紀子, 高
附真樹子, 武部雅人, 熊谷雄治, 東純一

8th World Congress on Clinical
Pharmacology and Therapeutics 2004 2004
年8月1日~6日 (Brisbane, Australia)
Population pharmacokinetics and
pharmacogenetics trial of isoniazid Ohno M,
Kubota R, Yokota S, Azuma J

第21回日本TDM学会学術大会, 2004年6月5日~
6日 (大阪) SSRI血中濃度の個体差に影響を
及ぼす因子の解析 Identification of the
pharmacokinetic factors involved in
variable plasma
concentrations of SSRIs 福田剛史, 池永有
香, 加藤正樹, 分野正貴, 福田和大, 奥川学,
延原健二, 木下利彦, 東純一

第21回日本TDM学会学術大会, 2004年6月5日~
6日 (大阪) 薬物代謝酵素の遺伝子型情報を
加味した生理学的薬物動態解析
Physiologically based pharmacokinetic
analysis considering genetic
polymorphisms in drug-metabolizing enzyme
大本まさのり, 大野雅子, 福田剛史, 渡邊悠
貴, 赤澤堅造, 東純一

第21回日本TDM学会学術大会, 2004年6月5日~
6日 (大阪) 結核治療の適正化に向けたイソ

ニアジドのTDMに対する提言 窪田竜二, 大野
雅子, 横田総一郎, 前倉亮治, 山本裕子, 古
塚深雪, 田邊智子, 東純一

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
K Hashimoto, M Takahashi, N Nakamura, K Ito, M Hashimoto, J Okada, S Hongo, and N Gemma	Electrochemical DNA chip for SNP analysis	S H Y Wong	Clinical Pharmacogenomics	AACC Press	米国	2005	in press

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
M Kato, Y Ikenaga, M Wakeno, G Okugawa, K Nobuhara, T Fukuda, K Fukuda, J Azuma and T Kinoshita	Controlled clinical comparison of Paroxetine and Fluvoxamine considering the serotonin transporter promoter polymorphism	Int. Clin. Psychopharmacol	in press		2005
Y Ikenaga, T Fukuda, K Fukuda, Y Nishida, M Naohara, H Maune and J Azuma	The frequency of candidate alleles for <i>CYP2D6</i> genotyping in the Japanese population with an additional respect to the -1584C to G substitution	Drug Metab. Pharmacokinet	in press		2005
R Kubota, M Ohno, M Yasunaga, S Yokota, R Maekura, J Azuma	Tentative treatments for tuberculosis based on N-acetyltransferase gene polymorphism.	Jpn J Therapeutic Drug Monitoring	in press		2005
福田剛史、東純一	ファーマコゲノミクス—テーラーメイド医療への道のり 薬物代謝酵素にかかわる個人差	医学のあゆみ	vol209 No. 6	351-356	2004

薬物代謝酵素のかかわる個人差

Interindividual genetic variability in drug metabolic enzymes



福田剛史(左) 東 純一(右)

Tsuyoshi Fukuda and Jun-ichi Azuma

大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学

○薬は“常用量でも毒”となる。この原因として薬の相互作用や加齢のような生理的要因がある。また、薬の効きすぎるヒト、効きにくいヒトの存在も知られ、この原因として、薬物代謝酵素のような薬物動態関連蛋白や、受容体のような薬物標的分子の遺伝子多型がある。本稿では、薬物代謝酵素の遺伝子多型の事例から“薬物応答の個人差”について考える。

Key Word : 薬物代謝酵素, 遺伝子多型, 血中濃度

医薬品の薬効や副作用には著しい個人差が認められることがある。この個人差を説明する要因のひとつに、薬物の体内濃度を規定する主因子である薬物代謝酵素の遺伝子多型がある。ここで、お酒の例をあげれば理解しやすいであろう。同量のお酒(薬物)を飲んでも人により酔い具合(効果・副作用)が異なる。これはアルコール代謝にかかわる2種の酵素に認められる遺伝子型の違いに依存する。すなわち、各個人に対する効果の差は、薬物応答にかかわる蛋白の遺伝子上の生来の違い(遺伝子多型)により起こる。一方、薬効は薬物の投与量ではなく、薬物の生体内での挙動とその標的分子近辺の濃度に依存する。このため、薬物の代謝能を事前に予測できれば、薬の有効率を高め、また効き過ぎによる副作用を回避することが可能となる。すなわち、代謝能の違いにより各個人に最適な薬物処方量が決定されることになる。

薬物代謝酵素とは?

一般的に“薬物代謝酵素”とは生体内に取り込まれた外来異物(薬物)の生体内での構造変換を行う酵素の総称として用いられる。薬物の大半を占める脂溶性化合物は水溶性の高い構造へと変化(代

謝)され、生体外に排泄される。薬物の代謝反応には酸化、還元、加水分解、水和などの第一相反応とさらに水溶性の高い構造への抱合反応を担う第二相反応がある。これらの反応(代謝)はほとんどが肝で行われ、通常は薬効をもつ化合物は不活性代謝物となり、薬効を失う。

第一相反応の中心的な役割を果たすのが薬物代謝酵素 Cytochrome P450(CYP)である。また、抱合酵素には、UDP グルコシルトランスフェラーゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、チオプリン S-メチルトランスフェラーゼ、スルホトランスフェラーゼなどがある。

これらの代謝酵素の活性には個人差があるため、生体内の薬物濃度に差が生じ、薬効に影響を及ぼす。そこで、個々の薬物(酵素の“基質”という)の代謝に関与する酵素とその寄与度を把握することが重要で、一般的に *in vitro* 系(肝ミクロソームや発現酵素)を用いて検討される。しかし、代謝全体に対する寄与の低い分子種であっても、その代謝産物が強い活性を有したり副作用に関連したりする場合もあり、注意が必要である¹⁾。

本稿では上記酵素に関する一部の例を紹介する

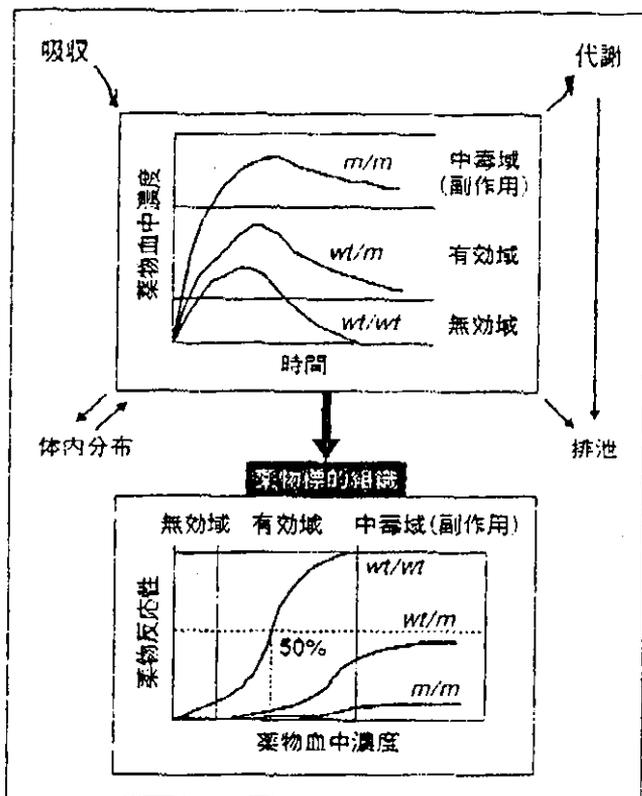


図1 薬物代謝酵素(上)および標的組織(下)の遺伝子多型と薬物反応性
 wt(wild): 正常遺伝子, m(mutant): 変異遺伝子.
 (上)wt/wt: extensive metabolizer, m/m: poor metabolizer.
 (下)wt/wt: レスポンダー, m/m: ノンレスポンダー.

にとどめるが、その詳細はそれぞれの酵素を取り上げて概説している文献をご参照いただきたい^{1,2,3)}。

遺伝子型と表現型

薬物代謝酵素についてはそれらの遺伝子型と薬物体内動態との関連性を示唆するデータがこれまでに多く集積されている。薬物に対する代謝能に異常のない extensive metabolizer (EM) 群と代謝能の欠損する poor metabolizer (PM) 群とに大別される。PM の表現型は酵素蛋白質に何らかの問題が生じた結果として起こる。つまり酵素発現がなかったり機能しない蛋白質が発現したりする。これらは遺伝子変異によるもので、ヒトが有する2本の対立遺伝子のうちの片方(ヘテロ)あるいは両方(ホモ)の対立遺伝子に変異を有する場合に表現型が変化する。このため、個々の代謝酵素の遺伝子型を判定すれば、表現型、すなわち薬物の血中

濃度を予測することが可能となる(図1)。

これまで遺伝子多型は異常な表現型を説明するために発見された遺伝子変異が大半で、基本的には表現型(活性)と遺伝子型との相関が得られている。しかし近年、遺伝子がゲノムワイドに網羅的に解析されるようになり、表現型が明確に示されていない遺伝子変異が多数報告されるようになった。遺伝子変異がただちに活性の低下にはつながらず、変異の意義を論じるのが困難な場合も多い。最終的には個々の変異が薬物代謝酵素の構造変化や発現量の差異による活性変化につながるかを調べ、ヒト個体において個別化薬物療法を行ううえで意義のある遺伝子多型を抽出する作業が不可欠である。そのためには臨床的研究による検証が必須であることは言を俟たない。

表現型と環境因子

一方、臨床応用を論じる場合には血中濃度に反映されるみかけ上の薬物代謝活性が併用薬や個人の病態などにより変化し、かならずしも遺伝子型との相関が認められない場合があることにも注意する必要がある。遺伝子型がEMであってもPMの表現型を示すこともあり、このような現象は phenocopy といわれる。抗うつ剤のパロキセチンは単回投与では CYP2D6 遺伝子型の影響が明確に観察されるが、連続投与によりその影響はみられなくなる。これは代謝物による代謝酵素阻害に起因すると考えられている。さらに、遺伝子多型で推測される活性のみならず、その活性に影響を及ぼしうる環境因子なども相加的・相乗的に考慮する必要がある。

ヒト薬物代謝型 CYPs

CYPには多くの分子種が報告されているが、ヒト肝の薬物代謝に関与するおもなCYP分子種はCYP1A2, 2A6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, および3A5である。また、最近ではCYP2B6, 2J2, 4Fファミリーも注目されるようになった⁴⁾。これらの分子種により代謝される代表的な薬物を表1に示した。これらの分子種には遺伝子多型が報告されている。遺伝子多型の最新情報は <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/> に掲載されているので

表 1 CYPs の代表的な基質薬物

CYPs	基質薬物
CYP1A2	チオフィリン, フェナセタン, メキシレチン, イミプラミン, プロプラノロール
CYP2A6	テガフル
CYP2B6	シクロフォスファミド
CYP2C8	バクリタキセル, アミオダロン, トリグリダゾン
CYP2C9	ワルファリン, トルブタミド, グリベンクラミド, トルサミド, グリメピリド, グリピジト, フェニトイン, ジクロフェナク, テノキシカム, ナプロキセン, メフェナム酸, ピロキシカム, セレコキシブ, ロサルタン, カンデサルタン
CYP2C19	オメプラゾール, ランソプラゾール, ジアゼパム, プログアニル, アミトリプチリン, イミプラミン, ヘキソバルピタール
CYP2D6	アミトリプチリン, ノルトリプチリン, イミプラミン, デシプラミン, クロミプラミン, ハロペリドール, チオリダジン, エンカイニド, フレカイニド, プロパフェノン, メキシレチン, リドカイン, チモロール, メトプロロール, プロプラノロール, プロメタジン, メキタジン, コデイン, パロキセチン, フルボキサミン, オンダンセトロン……その他多数
CYP2E1	アセトアミノフェン, エタノール, クロルゾキサゾン
CYP2J2	エバスチン, アステミゾール
CYP3A4	カルマバゼピン, シクロスポリン, タクロリムス, ベラパミル, トリアゾラム, エリスロマイシン, イリノテカン, ステロイド類, ミダゾラム, ベラパミル……その他多数
CYP3A5	ミダゾラム, アルプラゾラム, ベラパミル, ドセタキセル, タクロリムス, ニフェジピン

参考にされたい。

薬物体内濃度を決定しうる薬物代謝酵素の遺伝子多型の影響の程度は、①遺伝子多型が直接的に酵素発現に関与する場合(遺伝子欠損やスプライスマス、ストップコドンの出現による欠損)、②薬物と異常発現酵素との親和性、③当該酵素が基質薬物(複数の代謝酵素が関与する場合)の代謝に対する寄与度などで決定される。すなわち、個々の薬物により同じ多型でも影響の強度が異なるため、個々の薬物についてのデータが必要となる。遺伝子多型を有する分子種のうち、臨床的意義が示されているのは、CYP2D6、CYP2C9およびCYP2C19であり(表2)⁵⁾、2003年11月にFDAからだされた業界向けのガイダンス『Pharmacogenomics Data Submission(案)』でも言及されている。

CYP2D6

CYP2D6 は、β遮断薬、抗不整脈薬、抗うつ薬、

制吐剤など多くの医薬品を代謝する酵素である。また、合成麻薬であるメチレンジオキシメタンフェタミン(通称エクスタシー)も本酵素で代謝されることが示されている(表1)。

CYP2D6の遺伝子型はCYPsのなかでもっとも複雑で、40種以上の多型が報告されている。各多型の存在比率に人種間差が認められるため、配慮すべき多型が人種により異なるのは興味深い。日本人ではCYP2D6のPMは0.5%前後であるが、EMと比較して明らかに低活性を示す人(intermediate metabolizer(IM)とよばれる)が約20%の頻度で存在する。IMは東洋人に特異的なCYP2D6*10/*10や*5/*10の遺伝子型の保有者である⁶⁾。

典型的な例として、EMとPMの薬効に対する影響を検討したphenotyping試験の結果を示す。β遮断薬メトプロロールの代謝酵素はCYP2D6である。この経口投与ではPMの薬物血中濃度曲線下面積(AUC)はEMの約6倍にも達する。このとき薬効の面ではβ受容体の遮断作用が強くなり、