

厚生労働科学研究研究費補助金

小児疾患臨床研究事業

小児科診療における効果的薬剤使用のための遺伝子多型
スクリーニングシステムの構築に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：小崎健次郎

平成17(2005)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

小児科診療における効果的薬剤使用のための遺伝子多型スクリーニングシステムの構築に関する研究	小崎健次郎...	1
---	----------	---

II. 分担研究報告

CYP2C9 ハプロタイプとワーファリン維持量の関連解析	百々 秀心...	13
VKORC1 座位における日本人遺伝子多型とワーファリン必要量の解析	山岸 敬幸...	20
VKORC1 座位における日本人遺伝子多型の解析	菅谷 明則...	25
クロバザムおよびデスメチルクロバザムの血中濃度予測 —CYP2B6 の遺伝子多型の影響の評価—	高橋 孝雄...	29
ABC トランスポーター多型とメソトレキセート投与後の副作用の発症	熊谷 昌明...	37
高インスリン血症性低血糖症患者を対象としたジアゾキシドの薬物動態試験	長谷川奉延...	43
未承認薬の有効性・安全性を検討するための試験計画に関する研究 —ジアゾキシドの臨床研究を例として—	谷川原祐介...	52
TPMT*3C スクリーニング検査運用の実際	小崎健次郎...	68
マイクロペニスにおけるテストステロン治療効果関連因子： エストロゲン受容体 α 遺伝子のハプロタイプ解析	緒方 勤 ...	83
アミノ配糖体抗生物質と難聴 —ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の 臨床検査としての最適化に関する研究—	奥山 虎之...	86

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	91
--------------------------	----

IV. 研究構成員名簿.....	93
------------------	----

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
(小児疾患臨床研究:小児疾患臨床研究分野)

小児科診療における効果的薬剤使用のための遺伝子多型スクリーニングシステムの構築に関する研究

主任研究者 小崎 健次郎(慶應義塾大学医学部小児科 助教授)

研究要旨

①CYP2C9 ハプロタイプとワーファリン維持量の関連解析

現在、ワーファリンの効果を決める重要な要素として P450 酵素 CYP2C9 が知られている。今年度は、ワーファリン反応性を決める因子を新規に同定するために、ハプロタイプ解析を行った。4ヶ所の SNPs についてハプロタイプ構造を決定したところ、95%以上のハプロタイプが 2 つのパターンで代表されることが明らかにされた。両者のハプロタイプの頻度は、57%(当報告書ハプロタイプ1)および 38%(当報告書ハプロタイプ 3)であり、日本人を大きく 3 群に分類しうる(ハプロタイプ 1/ハプロタイプ 1; ハプロタイプ 1/ハプロタイプ 3; ハプロタイプ 3/ハプロタイプ 3)。これら 3 群におけるワーファリン反応性について INR を非説明変数、ハプロタイプを説明変数として haploscore 法により評価したが、ハプロタイプと INR に関連を認めなかった。日本人におけるワーファリンへの反応性は CYP2C9 以外の遺伝子座位によって規定されることが示唆された。

②VKORC1 座位における日本人遺伝子多型とワーファリン必要量の解析

昨年イギリスのグループが VKORC1(ビタミン K エポキシド還元酵素複合体1)の遺伝子変異によって出血傾向をきたすことを証明した。これを受けて VKORC1 の多型とワーファリンの効果についての研究が行われている。また 2005 年 1 月には、VKORC1 の多型がワーファリンの投与量と関連があるのではないかと報告がイタリアのグループから成された。日

本人において VKORC1 の多型の臨床的な意義はまだ検討が行われていない。本研究においては VKORC1 遺伝子座位の多型性を検討した後、2カ所の完全に連鎖する SNPs を同定して、この SNPs とワーファリンの維持量との関連性について検討を行った。VKORC1 多型におけるジェノタイプが、ワーファリン必要量に影響を与えるかどうかについて、INR を共役変数として共分散分析を行った。1173 C>T 多型における CT ヘテロ接合体群と TT ホモ接合体群のワーファリン維持量の依存性を検討した結果、両者の間に有意差を認めた(TT ホモ接合体群: 3.44g/日、CT ヘテロ接合体群: 5.06 g/日)。INR で補正して検討したところ、1173 C>T 多型における TT ホモ接合体と CT ヘテロ接合体との差がさらに明確となった(P=0.003)。

③VKORC1 座位における日本人遺伝子多型の解析
2005 年 1 月に、VKORC1 の多型がワーファリンの投与量と関連があるのではないかと報告がイタリアのグループから成された。日本人において VKORC1 の多型の臨床的な意義はまだ検討が行われていない。着目すべき多型や、その頻度は検討されていない。本研究では、VKORC1 座位の日本人における遺伝子多型を同定し各多型のアレル頻度を明らかにした。

④クロバザムおよびデスメチルクロバザムの血中濃度予測

クロバザム(CLB)の活性代謝物である N-デスメチルクロバザム(N-CLB)は、血中半減期が長く、定常状態における血中濃度が親化合物に比べ極めて高いことから、CLB 治療における効果や副作用の発症

に重要な影響を与える事が知られている。しかし、血中 N-CLB/CLB 濃度比には大きな個人差が認められるため、治療域の設定が困難な状況である。これまでの研究により N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および血中 N-CLB/CLB 濃度比に存在する大きな個人差は CYP2C19 の遺伝多型により説明できることを示した。しかし、CYP2C19 の多型によっても CLB の薬物動態の個人差を完全に説明することはできない。最近の in vitro の研究により CLB から NCLB への変換は CYP3A4 や CYP2B6 が担うことが明らかにされた。したがって、CLB の薬物動態の個人差を CYP3A4 や CYP2B6 多型により説明できる可能性が予測される。

本研究では、日本人において多型性の高い CYP2B6 の遺伝子多型部位 3 カ所について、簡便にタイピングしうる方法を開発し、クロバザム所要量との関連を評価した。体重あたりのクロバザム投与量により標準化した CLB 濃度に CYP2B6 多型が与える影響は小さく、クロバザム所要量の主たる決定因子は CYP3A4 誘導薬の併用の有無であった。

⑤ABCトランスポーター多型とメソトレキセート投与後の副作用の発症

MTX による毒性の標的臓器は口内炎・嘔吐などの消化器から、皮膚、中枢神経、肝、腎、および造血器(骨髄)まで多様である。各症例における毒性発症の予測は困難である。MTX の細胞外への汲み出しに ABCC4 が関与していること、またガン細胞が MTX に対する耐性を獲得する際に、ABCG2 が関与することから、本研究では小児 ALLあるいはリンパ芽球性リンパ腫症例において、ABC トランスポーター ABCC4,ABCCと相同性の高 ABCC5,ABCG2 の各遺伝子内の SNP と大量 MTX 療法に伴う毒性発症の関連を後方視的に解析した。ABCC4, ABCC5, ABCG2 遺伝子内の比較的頻度の高い多型における特定のアレル数と NCI スコアに基づく副作用の発症について前者を説明変数、後者を目的変数として解析した。ABCC5 内の複数の SNP について特定のアレル数の増加と NCI-CTC Grade 2 以上の嘔吐発症の増加に有意な関連を認めた。ABCC5 多型が毒性発症に関する個体差に寄与している可能性が示唆された。

⑥高インスリン血症性低血糖症患者を対象としたジアゾキシドの薬物動態試験

高インスリン血症性低血糖症の治療薬であるジアゾキシドの用法・用量を適正に設定するためには、血中薬物濃度を測定し薬物動態を検討することが必要である。本研究では、昨年 HPLC によるジアゾキシド血中濃度測定法を確立した。本年は、1. ジアゾキシドの有効性と安全性を評価するために、多施設共同研究「高インスリン血症性低血糖症を対象としたジアゾキシドの有効性・安全性評価試験」を立ち上げた。2. 血中濃度測定施設である当院において HPLC によるジアゾキシド血中濃度測定法を再検証し、測定方法の信頼性を確認した。3. ジアゾキシド投与中患者において血中濃度測定を行い、薬物動態の検討を開始した。平成 17 年 3 月現在までに、のべ 8 検体の血中濃度測定を行った。測定値はすべて測定濃度範囲内であった。今後対象数を増やし、母集団薬物動態解析(PPK)により薬物動態を解析すること、および有効性・副作用との関連を解析(PK/PD)し、ジアゾキシドの適正な使用法を明らかにすることが課題である。

⑦未承認薬の有効性・安全性を検討するための試験計画に関する研究

—ジアゾキシドの臨床研究を例として—

ジアゾキシドは、わが国では未承認でありながら、乳児期における高インスリン血症性低血糖症の第一選択薬であるため、長年にわたり使用されてきた。そこで本研究では、未承認薬であるジアゾキシドの有効性・安全性を評価するための臨床試験計画を立案し、医師主導治験への可能性を検討した。まず、未承認薬の試験計画として科学的、倫理的に妥当であるかどうか確認しながら、実施計画書、同意説明文書、症例報告書、試験薬概要書を作成した。試験の対象となる患者のほとんどが、すでに長期間当該薬剤を服用している実態があったため、それまでの使用方法を大きく逸脱することのないよう配慮した。また、試験に参加する患者に対しては公正な情報の開示を重視した。薬物動態を検討するための血中濃度測定では、分析法のバリデーションを行い、収集されるデー

タの信頼性を確保できた。本研究により立案した臨床試験は、未承認薬の医師主導治験へ可能性を広げていく上で有用なステップと考えられる。

⑧TPMT*3C スクリーニング検査運用の実際

小児リンパ芽球性白血病治療の中心的薬剤である 6メルカプトプリン(以下 6MP)はチオプリンメチル転移酵素(以下 TPMT)により不活化される。TPMT 機能の低下する多型を有する患者では 6MP 投与時に強い骨髄抑制が生じる。6MP やアザチオプリンの投与前に赤血球 TPMT 活性を測定して副作用を事前回避する試みが行われているが、輸血すると患者自身の TPMT 酵素活性を測定することが出来なくなる。そこで 6-MP 投与前に遺伝子検査を行ってリスクの高い患者を同定することが出来れば、低用量で治療を開始することにより副作用の発症を防止できると期待されている。白人において TPMT の活性の個人差を規定する要因として、現在*2、*3A、*3C 等の SNP が知られており、この SNPs を有する患者は、TPMT 活性が低値ないし中間値である者の 80 から 95%をしめる。変異アレルの種類と頻度は民族間で異なっている。我々は、日本人に認められる TPMT*3C 多型の患者情報を臨床で利用可能にする為、迅速な TPMT*3C 多型スクリーニングシステムを確立した。本稿では検査の運用の実際を報告する。

⑨マイクロペニスにおけるテストステロン治療効果関連因子:エストロゲン受容体 α 遺伝子のハプロタイプ解析

マイクロペニスは、最も軽症の外性器異常で、比較的頻度の高い疾患である。マイクロペニスは、最も軽症の外性器異常で、比較的頻度の高い疾患である。われわれは、マイクロペニスにおける男性ホルモンであるテストステロンエナント(TE)の筋肉注射の効果を解析している。TE は、外陰部細胞内においてアロマターゼにより女性ホルモンであるエストラジオールに変換され、エストロゲン受容体に結合することもできる。このエストロゲン効果は、男性化を妨げるため、マイクロペニスにおける TE 治療効果に影響しうる本年度は、このエストロゲン経路における遺伝子多型の影響を検討するため、エストロゲン受容体 α 遺伝子(ESR1)の

ハプロタイプ構造を決定した。

⑩アミノ配糖体抗生物質と難聴

一ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の臨床検査としての最適化に関する研究一

ミトコンドリア DNA 中に存在する A1555G ホモプラスミ一変異は、アミノグリコシド系抗生物質の投与による難聴誘発との関連性が指摘されている。本研究では、アミノグリコシド系抗生物質による副作用を未然に防ぐ為の手段として、ミトコンドリア DNA 変異のスクリーニング検査を実用化するための方法論について検討し、時間的には TaqMan プローブが有利で、コストの観点からは熱変性高速液体クロマトグラフィー法が有利であると考えられた。さらに、TaqMan プローブ法を利用して、血縁関係のない正常日本人 200 人のミトコンドリアDNAを解析したところ、A1555G ホモプラスミ一変異は検出されなかったことから、頻度は、0.5%以下と結論した。

A. 研究目的

①CYP2C9 ハプロタイプとワーファリン維持量の関連解析

ハプロタイプとは、染色体上のある部位のSNPsにおける対立遺伝子の組み合わせである。薬剤反応性と遺伝子多型の相関を調べる際、各多型を個別に評価するよりも、多型の組み合わせすなわちハプロタイプを評価する方が、統計学的な検出力が高いことが知られている。本研究では、日本人におけるCYP2C9 遺伝子座位近傍のハプロタイプ構造を明らかにし、このtSNPsにより構成されるハプロタイプとワーファリンの維持量の関連について検討した。

②VKORC1 座位における日本人遺伝子多型とワーファリン必要量の解析

ワーファリンは血栓形成性の疾患に対して用いられる抗凝固薬である。その投与量あたりの効果には大きな個人差があり、初期投与量の最適化は困難である。昨年イギリスのグループが VKORC1(ビタミン K エポキシド還元酵素複合体 1)の遺伝子変異によって出

血傾向をきたすことを証明した。本研究においては VKORC1 遺伝子座位の多型性を検討した後、2カ所の完全連鎖する SNPs を同定して、この SNPs とワーファリンの維持量の検討を行った。

③VKORC1 座位における日本人遺伝子多型の解析
現在、VKORC1 遺伝子座位については日本人において着目すべき多型や、頻度も不明である。われわれは、ワーファリン投与量の調節を目的としたこれまでの CYP2C9 遺伝子解析成績に VKORC1 の多型データを新たな検討項目としてくわえるために、VKORC1 遺伝子座位における多型マーカーを解析した。

④クロバザムおよびデスメチルクロバザムの血中濃度予測

クロバザム (CLB) の活性代謝物である N-デスメチルクロバザム (N-CLB) は、血中半減期が長く、定常状態血中濃度が親化合物に比べ極めて高いことから、CLB 治療における効果や副作用の発症に重要な影響を与える。しかし、血中 N-CLB/CLB 濃度比には大きな個人差が認められるため、治療域の設定が困難である。

これまでの研究により CYP2C19 遺伝子多型が N-CLB・CLB 代謝に及ぼす影響について検討した。しかし CYP2C19 の多型によっても CLB の薬物動態の個人差を説明することはできない。最近の研究において、CLB から N-CLB に代謝される過程に関わる酵素として CYP3A4 遺伝子の他に CYP2B6 遺伝子が関与していることが報告された。(Giraud et. al., 2004)。そこで、本研究では、日本人において多型性の高い多型部位 3 カ所について、タイピングを行う方法を開発し、クロバザム所要量との関連を評価した。

⑤ABC トランスポーター多型とメソトレキセート投与後の副作用の発症

大量 MTX 療法はロイコボリン救済 (calciumfolinate rescue: 以下 CFR) と併用して小児 ALL に対する中枢神経浸潤予防療法として広く用いられているが、一方で時に深刻な毒性を伴う。一部の症例における毒性発症の予測は困難であり、患者間の個体差が毒性発症に関与している可能性が示されている。

ABCC4、ABCC5、ABCG2 の多型が MTX 関連毒性発症の個体差に関与するとすれば、これらの分子の多型解析は「患者個人に最適な MTX 投与方法」の確立に貢献すると考えられる。我々は、小児 ALL あるいはリンパ芽球性リンパ腫症例において、ABCC4、ABCC5、ABCG2 多型と大量 MTX 療法に伴う毒性発症の関連を後方視的に解析した。

⑥高インスリン血症性低血糖症患者を対象としたジアゾキシドの薬物動態試験

ジアゾキシドは膵臓の β 細胞からのインスリンの分泌を抑制することにより血糖の上昇を促す薬剤で、高インスリン血症性低血糖症の第一選択薬である^{1)~3)}。欧米をはじめ世界 36 カ国で承認され使用されている。しかし、日本では未承認薬剤であり、20 年以上にわたり個人輸入の形式で使用されている。患者の多くは新生児と乳幼児であり、低血糖による後遺症は重篤で、適正使用は急務である。ジアゾキシドは、現在まで血中濃度測定が行われず、投与量と血中濃度の関係、さらに血中濃度と有効性・副作用との関係が明らかになっていない。そこで、本研究の目的は以下の3点である。1. ジアゾキシドの有効性と安全性を評価するために、多施設共同研究「高インスリン血症性低血糖症を対象としたジアゾキシドの有効性・安全性評価試験」を立ち上げる。2. HPLC によるジアゾキシド血中濃度測定法を再検証する。3. ジアゾキシド投与中患者において血中濃度測定及び臨床検査を行い、薬物動態を検討する。

⑦未承認薬の有効性・安全性を検討するための試験計画に関する研究

—ジアゾキシドの臨床研究を例として—

平成 14 年 7 月に薬事法が改正され、製薬企業に加えて、医師が主体となって治験を実施することが可能となった。これがいわゆる「医師主導の治験」である。この「医師主導の治験」の適用により、未承認薬の使用や適応外使用を余儀なくされている医師にとっては、当該薬剤の臨床研究を治験として実施する可能性が広がった。

ジアゾキシドは、わが国では未承認でありながら、乳児期における高インスリン血症性低血糖症の第一選択

薬であるため、長年にわたり使用されてきた。そこで本研究では、未承認薬であるジアゾキシドの有効性・安全性を評価するための臨床試験計画を立て、その臨床試験を治験として実施する上で考慮すべき事柄について検討した。

⑧TPMT*3C スクリーニング検査運用の実際

TPMT を欠損する患者では 6MP 投与時に強い骨髄抑制が生じる。臨床的経験からは、TPMT 欠損ホモ接合体患者に対する 6MP の至適投与量は常用量の 5 から 10% 程度である。6-MP 投与前に遺伝子検査を行ってリスクの高い患者を同定する試みは、我々もこれまで行ってきた。今回の検討は、実際の臨床に応用可能なシステムの構築を目的とした。特に*3C ジェノタイピングの検査結果を迅速に検査依頼者へ返却できるよう、簡便で安価な検査方法を DHPLC 法により確立、現実的な検査の運用を行った。

⑨マイクロペニスにおけるテストステロン治療効果関連因子:エストロゲン受容体 α 遺伝子のハプロタイプ解析

マイクロペニスは、最も軽症の外性器異常で、比較的頻度の高い疾患である。われわれは、マイクロペニスにおける男性ホルモンであるテストステロンエナンテート (TE) の筋肉注射の効果を解析している。この TE は、外陰部細胞において 5α 還元酵素 2 型により強力な男性ホルモンであるジヒドロテストステロンに変換された後、アンドロゲン受容体に結合し、陰茎伸展を招く。このため、われわれは、平成 14-15 年度において、アンドロゲン効果に密接に関与するアンドロゲン受容体および 5α 還元酵素 2 型の遺伝子多型を対象として解析した。

しかし、TE は、外陰部細胞内においてアロマターゼにより女性ホルモンであるエストラジオールに変換され、エストロゲン受容体に結合することもできる。このエストロゲン効果は、男性化を妨げるため、マイクロペニスにおける TE 治療効果に影響しうる。

本年度は、このエストロゲン経路における遺伝子多型の影響を検討するため、エストロゲン受容体 α 遺伝子 (ESR1) のハプロタイプ構造を決定した。さらに、特定ハプロタイプが外陰部異症に関与しうるか否かを

検討した。

⑩アミノ配糖体抗生物質と難聴

—ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の臨床検査としての最適化に関する研究—

1555 番目の塩基であるアデニンがグアニンに変化したミトコンドリア DNA のホモプラスミー個体は、ゲンタマイシンなどのアミノ配糖体系抗生物質を投与された場合、高頻度に感音性難聴という副作用を呈することが知られている。小児科臨床において、アミノグリコシド系抗生剤の投与が考慮されるのは、敗血症、細菌性髄膜炎などの重症感染症の治療においてでありで緊急を要する場合が少なくない。

本研究の目的は、ミトコンドリア A1555G 変異を正確・迅速に解析する方法を開発し、臨床検査としての最適化について検討することである。さらに、もっとも、検討した中で信頼性の高い方法を用いて、正常日本人 200 人を解析し、この遺伝子頻度を推定することである。

B. 研究方法

①CYP2C9 ハプロタイプとワーファリン維持量の関連解析

Ahmadi らの論文中に公表された CYP2C9 遺伝子の SNPs のうち、日本人において minor allele frequencies (MAFs) が 0.4 以上のものの中から 4 か所の SNPs を選出した。ワーファリン投与を受けている 31 名について、各プライマー対を用いて PCR 増幅を行い直接シーケンシング法によりジェノタイピングを行った。患者群は小児循環器外来に受診しワーファリンの単剤投与を受けている患者のうち内服用量が 3 ヶ月以上不変である 31 名について診療録から INR 値、投与量、体重を抽出した。対象となる患者集団の中に存在するハプロタイプを最尤法により推定し、頻度の高いハプロタイプと被説明変数との関連を分析する。

②VKORC1 座位における日本人遺伝子多型とワーファリン必要量の解析

患者 31 名が、慶応大学病院の小児心臓外来におい

でリクルートされた。ワーファリンの投与量との関連がイタリアのグループから示唆されている2つのVKORC1多型、rs9934438(C1173T)、およびrs7294(G3730A)について遺伝子多型解析を行った。それぞれの患者について、処方されている1日量のワーファリンとINRについて平均値を得た。

③VKORC1座位における日本人遺伝子多型の解析
連結不能匿名化された日本人正常対照検体100サンプルを用いて検討した。キアゲン QIAamp®脱塩カラムによって全血からゲノムDNAを抽出し、PCR増幅を行い、直接シーケンシング法によりジェノタイピングを行った。

④クロバザムおよびデスメチルクロバザムの血中濃度予測

慶應義塾大学大学病院の小児神経外来に通院中でんかん患者を対象とした。CLB錠剤ないし顆粒製剤(大日本製薬マイスタン)を経口投与されており、処方量が4週間にわたって不変である患者を解析対象とした。全血からゲノムDNAを抽出、PCR増幅を行い、直接シーケンシング法によりジェノタイピングを行った。

多重回帰モデルにより変異アレルの個数とCLB血中濃度の関係性を評価した。

⑤ABCトランスポーター多型とメソトレキセート投与後の副作用の発症

1992年から2003年の間に慶應義塾大学病院、で治療が行われたALL、またはリンパ芽球性リンパ腫例で、他の細胞障害性薬剤の全身投与による併用なく大量MTX(3g/m²)の投与が行われた症例を研究対象とした。化学療法には東京小児がん研究グループ(Tokyo Children's Cancer Study Group: TCCSG)によるTCCSG L92-13, L95-14, L99-15, NHL-T9604のいずれかのプロトコールがインフォームドコンセントを得た後に用いられた。ABCC5, ABCC2, ABCG2多型について直接シーケンシング法および熱変性高速液体クロマトグラフィー法によりジェノタイピングを行った。多型と毒性発症の関連をGEE法で解析した。

⑥高インスリン血症性低血糖症患者を対象としたジ

アゾキシドの薬物動態試験

多施設共同研究「高インスリン血症性低血糖症を対象としたジアゾキシドの有効性・安全性評価試験」を立案し、ジアゾキシドの治療経験のある85施設の主治医に対し実施計画書、同意説明文書および調査書等を送付した。実施計画書、同意説明文書の概要は以下のとおりである。1. 多施設共同研究に関して患者及び/または保護者の同意を得る。2. 調査書を用いて、診断名、ジアゾキシド投与量、体重・身長・血圧、血液検査結果、ジアゾキシド最終内服時刻および採血時刻、服用状況等を確認する。3. ジアゾキシドの血中濃度測定用の血清を回収する。

ジアゾキシドの血中濃度は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて測定した⁴⁾。

血清試料100μlに0.33mol/L過塩素酸溶液、水メタノール混液(1:1)、内標準物質溶液(IS溶液)であるフェナセチンを加え混合し、蛋白を沈殿させる前処置を行ったのち、遠心分離後上澄をHPLCで測定した。

HPLCの測定条件:移動相A液:1ml/L酢酸含有0.01mol/L1-ペンタンスルホン酸ナトリウム溶液/B液:メタノールを25分かけてグラジエントさせて溶出した。

機器条件

カラム:Inertsil ODS3(5μm)4.6×150mm

検出器:UV270nm

注入量:20μl

濃度計算方法 得られた検量線試料のクロマトグラムから、ISに対するSTD(標準物質)のピーク面積比を求め、検量線濃度とピーク面積比との関係から、直線回帰(Weight = 1/X²)させ、回帰式及び相関係数(r)を求めた。また、STD添加試料のクロマトグラムからISに対する各成分のピーク面積比を得られた回帰式に代入し、測定濃度を求めた。測定濃度範囲は0.5-200μg/ml内部とした。

⑦未承認薬の有効性・安全性を検討するための試験計画に関する研究

—ジアゾキシドの臨床研究を例として—

臨床研究を計画するにあたり、実施計画書、症例報

告書、同意説明文書、試験薬概要書を作成した。実施計画書および同意説明文書は、東京大学医学部附属病院治験審査委員会・臨床試験部が Web で公開している手引¹⁾を参考にして作成した。また、症例報告書の作成にあたっては、ジアゾキシドの有効性評価および安全性評価を適切に行うための観察項目、検査項目およびその実施間隔について検討した。さらに薬剤の有効性並びに安全性を評価するためには、薬物動態情報が必須であると考え、血中濃度測定のためのサンプリングポイントについて検討し、症例報告書に追記した。試験薬概要書として、米国の添付文書をシェリング・プラウより入手し日本語訳を行って添付した。さらに、治験を行う際には血中濃度測定を行う施設における測定法のバリデーション²⁾が必要であるため、合わせて行った(長谷川分担研究報告書参照)。

⑧TPMT*3C スクリーニング検査運用の実際

2004 年から 2005 年まで、外部施設より送付された 11 検体を対象にスクリーニングを行った。依頼時は各医療機関にて、「チオプリンメリル転移酵素 (TPMT) の遺伝子多型による薬剤反応性の予測に関する研究」の実施について説明の上、本人および家族の同意を得た。全血から QIAGEN 社脱塩カラムによりゲノム DNA を抽出。PCR 増幅を行い、熱変性高速液体クロマトグラフィー法によりジェノタイピングを行った。

C. 研究結果

①CYP2C9 ハプロタイプとワーファリン維持量の関連解析

各ハプロタイプとワーファリン投与量との関連には統計的に有意ではなかった。このため、ハプロタイプ特異的 p 値を評価することは出来なかった。

②VKORC1 座位における日本人遺伝子多型とワーファリン必要量の解析

1173 C>T 多型および 3730G>A 多型についてジェノタイピングをおこなった結果、26 名の患者(84%)が 1173 C>T 多型について TT ホモ接合体であり、5 名の患者(16%)が CT ヘテロ接合体であった。C のホ

⑨マイクロペニスにおけるテストステロン治療効果関連因子:エストロゲン受容体 α 遺伝子のハプロタイプ解析

対象は、コントロール男性 100 例と停留精巣患者 63 例である。ESR1 のゲノム DNA 全長(>300kb)にわたり 6-38kb 間隔で存在し、マイナーアレル頻度 15%以上の SNP15 個(SNP1-SNP15)(図 1)を TaqMan 法で解析し、遺伝統計学的解析によりハプロタイプブロックを決定した。その後、患者_健常者間において連鎖不平衡領域のハプロタイプ頻度を比較した。

⑩アミノ配糖体抗生物質と難聴

—ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の臨床検査としての最適化に関する研究—

ミトコンドリア A1555G 変異を以下に示す種々の方法での検出を試みた。

(1)PCR-直接塩基配列決定法

(2)PCR-RFLP 法

(3)TaqMan プローブ

(4) 熱変性高速液体クロマトグラフィーこれらを用いた SNP 解析法を試み、おのおの方法の検査にかかる時間費用を比較検討した。

2. 上記の検討の結果、最も短時間で明瞭な結果が得られた TaqMan プローブ法を用いて、血縁関係のない日本人 200 人における遺伝子解析を行い、この遺伝子変異頻度を推定した。

モ接合体の者はいなかった。計算されたアレル頻度は T アレルが 91.2%、C アレルが 8.8%であった。1173 C>T 多型について TT ジェノタイプであったものは、3730G>A 多型についてはすべて GG ジェノタイプであり、また 1173 C>T 多型について CT ヘテロ接合体であったものは、3730G>A 多型についてすべて AG ヘテロ接合体である。つまりすべての患者は 1173 C>T 多型および 3730G>A 多型について完全な連鎖不平衡を呈していた。

1173 C>T 多型における CT ヘテロ接合態群と TT ホモ接合体群のワーファリン維持量の依存性を検討した結果、両者の間に有意差を認めた(TT ホモ接合体群: 3.44g/日、CT ヘテロ接合態群: 5.06 日)。INR

で補正したワーファリンの投与量との間を検討したところ、1173 C>T 多型における TT ホモ接合体と CT ヘテロ接合体との差は有意であった(p=0.003)

③VKORC1 座位における日本人遺伝子多型の解析
日本人においては VKORC1 の翻訳領域内(エクソン 1~3)において遺伝子多型は検出されず、イントロン内の 2 多型についてのみ頻度を認めた。

④クロバザムおよびデスメチルクロバザムの血中濃度予測

多重回帰モデルにより変異アレルの個数とクロバザム血中濃度の関係性を評価した Gln172His、Lys262Arg のいずれの多型についても、クロバザムの定常状態の血中濃度に大きな影響を与えないことが示された。

Arg262 アレル数と体重あたりのクロバザム投与量により標準化した clb 濃度に関連を認めなかった。3 名の outlier(外れ値)がいたが、その原因は不明であった。外れ値を除いた解析結果は不変であった。

⑤ABCトランスポーター多型とメソレキセート投与後の副作用の発症

ABCC5 多型について各リスクアレルのアレル数の増加と NCI-CTC Grade 2 以上の嘔吐発症に有意な関連を認めた。ABCC4 座位および ABCG2 座位内の SNPs について同様に解析したが、いずれの副作用発症についても有意な関連を認めなかった。

⑥高インスリン血症性低血糖症患者を対象としたジアゾキシドの薬物動態試験

i) データの収集

多施設共同研究「高インスリン血症性低血糖症を対象としたジアゾキシドの有効性・安全性評価試験」は慶應義塾大学病院臨床治験審査委員会(IRB)で 2004 年 7 月 29 日に承認され、2004 年 8 月から 3 年間の予定で調査を開始した。平成 17 年 3 月現在までに 3 施設 5 名の患者が登録された。男女比=4:1、年齢 11 ヶ月から 9 歳 9 ヶ月、発症は日齢 1 から 3 歳 2 ヶ月、現在の内服になってからの期間は 24 日間から 6 年 6 ヶ月であった。

ii) HPLC によるジアゾキシドの血中濃度測定法の再検証

HPLC によるジアゾキシドの血中濃度測定法を、測定施設である当院で再検証した。確認項目である、特異性、検量線の濃度範囲と直線性、同時再現性、回収率、分析中の 48 時間安定性の測定結果は、すべて許容範囲内であった。以上のように当院でのヒト血清中ジアゾキシドの HPLC による濃度測定は信頼できることを確認した。

iii) ジアゾキシドの血中濃度測定結果

現在までに 5 名の患者が登録され、のべ 8 検体の血中濃度測定を行った。

⑦未承認薬の有効性・安全性を検討するための試験計画に関する研究

—ジアゾキシドの臨床研究を例として—

(ア)実施計画書の作成

実施計画書は、以下の項目で構成した。

1. 試験の背景
2. 試験の目的
3. 試験に参加する主な施設と共同研究者
4. 試験薬の概要
5. 対象患者
6. 被験者に説明し、同意を得る方法
7. 試験の方法
8. 調査を行う事項等
9. 解析を行う項目及び方法
10. 中止基準
11. プライバシーの配慮
12. 有害事象発生時の取り扱い
13. 患者の費用負担

(イ)同意説明文書の作成

本試験では、対象となる患者が新生児、乳児、幼児、および小児であるため、同意説明文書は患者の親権者(または実質的保護者)に渡し、文書および口頭による十分な説明を行って同意を文書で得ることとした。また、患者が 9 歳以上の場合は患者本人の同意も口頭で得るものとした。

(ウ)症例報告書の作成

症例報告書(添付資料 2 参照)を作成する際に留意したことは、患者のプライバシーへの配慮から、氏

名やイニシャルは記載せず、被験者識別コードで管理するよう作成したことである。また、臨床試験は多施設で行われるため、収集したい情報をすべて網羅し、直接閲覧を要しない症例報告書を作成することが重要と考えた。

(エ) 試験薬概要書の作成

入手した添付文書は、高インシュリン血症に起因する低血糖症を適応症としたカプセル剤および懸濁剤 (Proglucem[®]) の米国添付文書 (Schering-plough) であった。この資料により、薬効、薬理効果はもちろんであるが、ジアゾキシドの有害事象および薬物相互作用について十分な情報を得ることができた (添付資料 3)。わが国における使用実態ではほとんど頻度のない副作用でも、添付文書に記載されている、薬理学上予期される臨床上的危険性は開示されるべきである。

(オ) 血中濃度測定法のバリデーション

血中濃度測定を行う施設において次の項目についてバリデーションを行った。

- ① 特異性 (検体 6 個体)
- ② 検量線の濃度範囲と直線性 (0.5-200 µg/ml)
- ③ 同時再現性
- ④ 回収率
- ⑤ 分析中の 48 時間安定性
- ⑧ TPMT*3C スクリーニング検査運用の実際
熱変性高速液体クロマトグラフィー法では、増幅産物内の変異は、クロマトグラム中の異常ピークとして検出される。前向き研究開始後、現時点では、TPMT*3C 多型患者は同定されていない。検査依頼時、患者が今後 6MP を投与する事が明記されている場合、検査によって今後の治療に支障が出ないよう至急の対応をしており、結果返却までの所要期間は 10 日以内であった。
- ⑨ ミクロペニスにおけるテストステロン治療効果関連因子: エストロゲン受容体 α 遺伝子のハプロタイプ解析
ハプロタイプブロック (連鎖不平衡係数 0.9 以上) は、コントロール男性 100 例と停留精巢患者 63 例共に 3' 側の SNP10-14 を包含する約 50kb 領域で同定された

(図 2)。この領域の主要ハプロタイプは 4 個存在し、そのうち、AGATA ハプロタイプの推定頻度が、患者と健常者で有意に異なり、この有意差はハプロタイプが劣性効果を有すると仮定すると顕著になった。このハプロタイプのホモ接合体頻度は、患者のみに求められ、その頻度は患者と健常者で顕著に異なった。

⑩ アミノ配糖体抗生物質と難聴

—ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の臨床検査としての最適化に関する研究—

TaqMan プローブ法の結果は明瞭で、しかも採血から 4 時間以内に結果報告が可能であった。また、TaqMan プローブ法により検討した日本正常集団 200 人では、ミトコンドリア遺伝子のなかに、A1555G ホモプラスミー変異を有する個体は存在しなかった。

D. 考察

① CYP2C9 ハプロタイプとワーファリン維持量の関連解析

日本人におけるワーファリンへの反応性は CYP2C9 以外の遺伝子座位によって規定されることが示唆された。

② VKORC1 座位における日本人遺伝子多型とワーファリン必要量の解析

われわれは VKORC1 の 1173 C>T 多型における TT ホモ接合体群と CT ヘテロ接合体群との間でワーファリン所要量との間に有意な差があることを示した。CT ヘテロ接合体は TT ホモ接合体に比べて、より多量のワーファリンを必要とするということが明らかになった。この成績はイタリアの研究結果において CT ヘテロ接合体が TT ホモ接合体より多量のワーファリンを必要とすることと合致するものであった。

③ VKORC1 座位における日本人遺伝子多型の解析

日本人において比較的頻度の高い CYP2B6 の遺伝子型を簡便にタイピングしうる方法を開発した。

体重あたりのクロバザム投与量により標準化した CLB 濃度を比較すると、Gln172His 多型について、His172 を 1 個持つ群 (すなわち Gln/His ヘテロ接合体) では 410、Gln/Gln ホモ接合体群では 520 と、前者が後者

に比して低い傾向を認めた。CYP2B6 タンパクの第172 アミノ酸グルタミンがヒスチジンに置換されている場合(Gln172His)は、酵素活性が約 2 倍に上昇しているというin vitroの報告に合致する傾向であった。しかし、上記の傾向は統計学的には有意と云えず、3A4 誘導性抗いれん薬の併用のほうが CLB 血中濃度に大きな影響を与える(p=0.0002)ことが示された。Lys262Arg のいずれの多型についても、CLB の定常状態の血中濃度に大きな影響を与えないことが示された。

④ABCトランスポーター多型とメソトレキセート投与後の副作用の発症

毒性発症に関与する因子の検索は、「患者個人に最適な治療」の確立を目指す上で重要な課題と考えられる。

今回検討した多型は、いずれもタンパクの機能に直接的な影響をあたえることが示されていない多型である。ABCC5 遺伝子のほぼ全領域にわたり、嘔吐発症との関連が示されたことから、ABCC5 座位の特定のハプロタイプが、嘔吐の発症と関連している可能性があり、プロモーター領域を含めて、各ハプロタイプの機能解析を進める必要がある。MTX 投与による各臓器における毒性発症の詳細な機序は明らかでない。それぞれの毒性発症が MTX 自体の標的臓器への直接作用であるのか、間接的な作用が主体であるのかも明確ではない。

副作用発症の予測のためにはMTXの血中濃度ばかりでなく、ABCC5 多型など、CNS 等の体内の各コンパートメントにおける薬物動態を規定する遺伝子の多型を考慮する必要があると示唆された。

⑤クロバザムおよびデスメチルクロバザムの血中濃度予測

翻訳領域内の多型 rs17881770 (129C>T at Cys43)、rs7200749 (3462C>T Leu120)は、日本人においてはその頻度は極端に低いことが示された。ヨーロッパのグループより VKORC1 の 112G>T Asp38Tyr、3556G>A Arg151Gln などが報告されているが、日本人では検出されなかった。非翻訳領域の rs9934438(C1173T)、rs7294(G3730A)の2SNPs は、

多型性が高いことが示された。(ワーファリン維持量との関連性については山岸分担研究者の研究報告書を参照)。

⑥高インスリン血症性低血糖症患者を対象としたジアゾキシドの薬物動態試験

今回測定したジアゾキシドの血中濃度は 5.60～43.85 ($\mu\text{g/ml}$) であり、すべて測定濃度範囲内(0.5-200[$\mu\text{g/ml}$])であり、濃度範囲設定は妥当と考えた。また、これらの測定値は、1974 年 Pruitt ら³⁾の報告結果と相違しなかった。Pruitt らの報告では、3人の小児のジアゾキシドの血中濃度は維持量内服で15-50 $\mu\text{g/ml}$ であった。また、case2 で、最終内服から採血時刻までの時間をほぼ統一して3回血中濃度を測定したところ、ほぼ同じ値を得た(表8)。ジアゾキシドの薬物動態⁸⁾は十分に解明されていないため、ほぼ同じ血中濃度であった結果を2通りに解釈可能である。第1は“長期投与中の患者において血中濃度の日内変動はない”可能性、第2は“長期投与中の患者においても血中濃度の日内変動は存在する”可能性である。ジアゾキシドの半減期は 28 ± 8.3 時間^{5) 9) 10)}であることは第1の可能性を示唆する。しかし上記2つの可能性を鑑別するために、対象数を増やすこと、および最終内服から採血時刻までの時間をばらつかせて検討すべきである。最終的には母集団薬物動態解析(PPK)により薬物動態を解析し、適切な投与回数や用量を検討したい。

⑦未承認薬の有効性・安全性を検討するための試験計画に関する研究

—ジアゾキシドの臨床研究を例として—

薬物動態情報を得るための試験を行うには、綿密な試験計画、適切な採血プロトコールと正確な記録、合理的な解析手法に加え、信頼できる分析法を用いることが必要である。特にジアゾキシドの場合は未承認薬であり、製薬会社を含め国内には血中濃度測定を行える施設が存在しなかった。そこで、本臨床試験の計画と並行してジアゾキシドの定量法の確立と血中濃度測定法のバリデーションが必須であった。信頼できるデータを得るためには分析法の妥当性は科学的に検証されなければならない。生体試料の分析

であることを常に念頭に置き、試料の安定性や抽出の安定性、操作ごとのばらつき的大小などを検証する目的で、バリデーションを行った。その結果良好な結果が得られ、信頼できる血中濃度データを収集できるものと考えられる。

⑧TPMT*3C スクリーニング検査運用の実際

日本人に認められる TPMT*3C 多型の患者情報を臨床で利用可能にする為、迅速な TPMT*3C 多型スクリーニングシステムを確立したと考えられる。

⑨マイクロベニスにおけるテストステロン治療効果関連因子:エストロゲン受容体 α 遺伝子のハプロタイプ解析

以上の成績は、ESR1 遺伝子に特定ハプロタイプがハプロタイプブロックが存在することを世界で初めて示したものである。ESR1 のような巨大な遺伝子では各々の SNP の関連解析は困難であり、ハプロタイプ解析を行うことが望まれる。また、SNP 12 の A アリルはこの特定ハプロタイプに特有であった(表1)。したがって、この A アリルはハプロタイプ解析の代表として解析に用いようと期待される。

さらに、特定ハプロタイプの頻度がコントロール男性と停留精巣患者の間で顕著に異なり、劣性効果を有する ESR1 の特定ハプロタイプが停留精巣の発症に関与することが示唆された。これは、エストロゲン様効果を有する内分泌攪乱物質の影響と解釈され、この特定ハプロタイプが、外陰部異常症発症のみならず TE の薬剤応答性に関与しうると示唆する所見と推測される。

⑩アミノ配糖体抗生物質と難聴

一ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の臨床検査としての最適化に関する研究一

今回の検討により時間的には TaqMan プローブが有利で、コストの観点からは熱変性高速液体クロマトグラフィー法が有利であると考えられた。緊急性に応じて両者を使い分けることが理想的であると考えられた。

E. 結論

①CYP2C9 ハプロタイプとワーファリン維持量の関連解析

VKORC1 は日本人におけるワーファリン反応性の一部を規定している。今後、遺伝子検査によりワーファリン反応性を予測する場合には、VKORC1 座位を含め、CYP2C9 以外の座位に注目した検討が必要である。

②VKORC1 座位における日本人遺伝子多型とワーファリン必要量の解析

1173 C>T多型におけるCTヘテロ接合体群とTTホモ接合体群のワーファリン維持量の依存性を検討した結果、両者の間に有意差を認めた(TTホモ接合体群: 3.44g/日、CTヘテロ接合体群: 5.06日)。INRで補正したワーファリンの投与量との関係を検討したところ、1173 C>T多型におけるTTホモ接合体とCTヘテロ接合体との差がさらに明確となった(P=0.003)。

③VKORC1 座位における日本人遺伝子多型の解析
遺伝子解析を行う上で、その遺伝子上に存在する多型の位置や頻度といった基礎的なデータは、以降の研究プロトコルを作成する際に不可欠な情報である。今回、未だ情報の少ないVKORC1遺伝子の日本人多型に関する情報を得た。本研究においては、1173T>C多型におけるCCホモ接合体が同定されなかった。サンプル数を増やすことにより、日本人における頻度を明らかにする必要がある。

④クロバザムおよびデスメチルクロバザムの血中濃度予測

クロバザム所要量とCYP2B6多型・CYP3A4誘導薬の併用の有無の関連を評価した。体重あたりのクロバザム投与量により標準化したCLB濃度にCYP2B6多型が与える影響は小さく、クロバザム所要量の主たる決定因子はCYP3A4誘導薬の併用の有無であった。

⑤ABCトランスポーター多型とミノレキセート投与後の副作用の発症

小児 ALL あるいはリンパ芽球性リンパ腫症例において、葉酸輸送蛋白 Reduced folate carrier 1 80G/A 多型と大量 MTX 療法に伴う毒性発症の関連を 15 例における 43 回の MTX 投与を対象として後方視的に解

析した。A アレル数の増加と NCI-CTC Grade 2 以上の嘔吐発症の減少に有意な関連を認めた (Odds Ratio=0.319, P=0.034)。RFC1 多型による個体差が毒性発症に寄与した可能性が示唆される。

⑥高インスリン血症性低血糖症患者を対象としたジアゾキシドの薬物動態試験

HPLCによる血清中ジアゾキシド濃度測定法は信頼できることを確認した。多施設共同研究を立ち上げ、実際にジアゾキシド血中濃度測定を開始した。今後の課題は、対象数を増やした上でPPK及びPK/PD解析を行い、ジアゾキシドの適正な使用方法を明らかにすることである。

⑦未承認薬の有効性・安全性を検討するための試験計画に関する研究

—ジアゾキシドの臨床研究を例として—

ジアゾキシドの有効性・安全性を検討するための臨床試験計画を立案した。本臨床試験は、未承認薬の医師主導治験へ可能性を広げていく上で有用なステップと考えられる。

⑧TPMT*3C スクリーニング検査運用の実際

TPMT*3C 多型のスクリーニング検査を多施設共同研究として実施した。検査依頼から検査終了までの日数は平均 10 日で、匿名化についても問題なく実施し得た。今後、臨書検査として TPMT*3C 多型検査を実施する基盤が整備された。

⑨マイクロペニスにおけるテストステロン治療効果関連因子:エストロゲン受容体 α 遺伝子のハプロタイプ解析

ハプロタイプブロック(連鎖不平衡係数 0.9 以上)は、コントロール男性 100 例と停留精巣患者 63 例共に 3' 側の SNP10-14 を包含する約 50kb 領域で同定された。この領域の主要ハプロタイプは 4 個存在し、そのうち AGATA ハプロタイプの推定頻度が、患者と健常者で有意に異なり、この有意差はハプロタイプが劣性効果を有すると仮定すると顕著になった。このハプロタイプのホモ接合体頻度は、患者のみに求められ、その頻度は患者と健常者で顕著に異なった。SNP 12 の A アレルはこの特定ハプロタイプに特有であった(表 1)。したがって、この A アレルはハプロタイプ解析の

代表として解析に用いられると期待される。

⑩アミノ配糖体抗生物質と難聴

—ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の臨床検査としての最適化に関する研究—

今回の検討によりミトコンドリア A1555G 変異スクリーニングのためには時間的には TaqMan プローブが有利で、コストの観点からは熱変性高速液体クロマトグラフィー法が有利であると考えられた。緊急性に応じて両者を使い分けることが理想的であると考えられた。また、頻度は低いものの、その簡便さ、有用性を考慮すると、アミノグリコシド系抗生物質の投与を行う前には、全例でこの検査を施行すべきであると結論する。

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金
(小児疾患臨床研究：小児疾患臨床研究分野)

CYP2C9 ハプロタイプとワーファリン維持量の関連解析
分担研究者 百々 秀心 (国立成育医療センター 循環器科 医長)

研究要旨 ワーファリンはビタミン K 依存性血液凝固因子の産生の阻害を通じて、血液凝固能を低下させる抗凝固剤として高頻度に使われている薬剤である。心臓手術を含む外科手術後に、血栓が形成されやすい病態の時に投与される。ワーファリンの最も重要な合併症は出血傾向である。出血傾向を防ぐために様々な計算式が作成されているが、その投与量あたりの効果には大きな個人差があり、臨床上問題視されている。現在、ワーファリンの効果を決める重要な要素として P450 酵素 CYP2C9 が知られている。CYP2C9 には多型性のある 2 つのアレル、*2 と *3 が存在するが、日本人においては *2 の頻度は低く、*3 の頻度は約 20-30 人に 1 人の割合である。これまでの研究班の研究でも 2 名の *3 患者を同定している。しかしながら日本人におけるワーファリンの効果を説明する上で、*3 の頻度は低いため他の要因を探索する必要があった。今年度は、ワーファリン反応性を決める因子を新規に同定するために、ハプロタイプ解析を行った。4ヶ所の SNPs についてハプロタイプ構造を決定したところ、95%以上のハプロタイプが 2 つのパターンで代表されることが明らかにされた。両者のハプロタイプの頻度は、57% (当報告書ハプロタイプ 1) および 38% (当報告書ハプロタイプ 3) であり、日本人を大きく 3 群に分類しうる (ハプロタイプ 1/ハプロタイプ 1; ハプロタイプ 1/ハプロタイプ 3; ハプロタイプ 3/ハプロタイプ 3)。これら 3 群におけるワーファリン反応性について INR を非説明変数、ハプロタイプを説明変数として haploscore 法により評価したが、ハプロタイプと INR に関連を認めなかった。日本人におけるワーファリンへの反応性は CYP2C9 以外の遺伝子座位によって規定されることが示唆された。

研究協力者

小崎健次郎 慶應義塾大学医学部小児科 助教授
山岸敬幸 慶應義塾大学医学部小児科学専任講師
山岸千尋 慶應義塾大学医学部小児科 医師
菅谷明則 東京都立清瀬小児病院循環器科 医長
泉 幸佑 慶應義塾大学医学部小児科 医師
鳥居 千春 慶應義塾大学医学部小児科学 研究員
高橋大輔 慶應義塾大学医学部小児科学 研究員

A. 研究目的

ワーファリンはビタミン K 依存性血液凝固因

子の産生の阻害を通じて、血液凝固能を低下させる抗凝固剤として広く処方されている薬剤である。心臓手術を含む外科手術後や心房細動患者など血栓が形成されやすい病態の時に投与される。ワーファリンの最も重要な合併症は出血傾向である。出血傾向を防ぐために様々な計算式が作成されているが、その投与量あたりの効果には大きな個人差があり、臨床上問題視されている。この観点から、当研究班では初年度に「ワーファリンの投与量と INR の相関についてのノモグラムの作成」研究を行ったが、その予測精度は必ずしも高くなかった。

として P450 酵素 CYP2C9 が知られている。CYP2C9 には多型性のある2つのアレル、*2 と *3 が存在するが、日本人においては*2 の頻度は極端に低く、*3 の頻度は約 20・30 人に 1 人の割合である。これまでの研究班の研究でも 2 名の*3 患者を同定している。しかしながら日本人におけるワーファリンの効果を説明する上で、*3 の頻度は低いため他の要因を検索する必要があった。今年度は、ワーファリン反応性を決める因子を新規に同定するために、ハプロタイプ解析を行った。

ハプロタイプとは、染色体上のある部位の SNPs における対立遺伝子の組み合わせである。

これまでの遺伝子多型解析の研究から近傍の SNPs は強い関連性をもち一連のセットで遺伝することが明らかにされた。このまとまりをハプロタイプブロックという。このハプロタイプブロック内の SNPs 間に強い関連性が見られるということは、この領域での多型性のほとんどは限られた SNPs で代表することができる。この領域を代表する SNPs をタグ SNPs (以下 tSNPs) という。すなわちこの手法を採ることで、ハプロタイプを同定することに必要な SNP はわずかな数で済み、効果的な解析およびジェノタイピングの効率化をはかることができる。

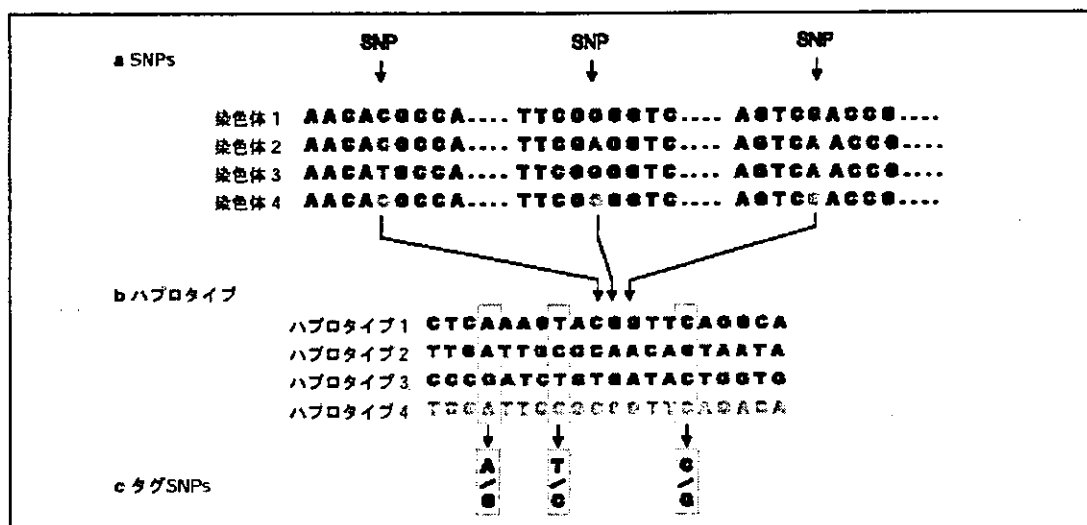


図 1. SNPs、ハプロタイプ、tSNP の概念図

薬剤反応性と遺伝子多型の相関を調べる際、各多型を個別に評価するよりも、多型の組み合わせすなわちハプロタイプを評価する方が、統計学的な検出力が高いことが知られている。ハプロタイプ解析の有用性に鑑みて、近年、薬物代謝酵素のハプロタイプに関するデータが急速に蓄積されている。本年1月にAhmadiらのグループが、約50の薬物代謝酵素について、白人および日本人におけるtSNPsを選定し、tSNPsを用いた検討の有用性と蓋然性を実証した。本研究では、日本人におけるCYP2C9遺伝子座位近傍のハプロタイプ構造

を明らかにし、このtSNPsにより構成されるハプロタイプとワーファリンの維持量の関連について検討した。

B. 研究方法

Ahmadi らの論文中に公表された CYP2C9 遺伝子の SNPs のうち、日本人において minor allele frequencies (MAFs) が 0.4 以上のものの中から 4 か所の SNPs を選出した。(図 2)

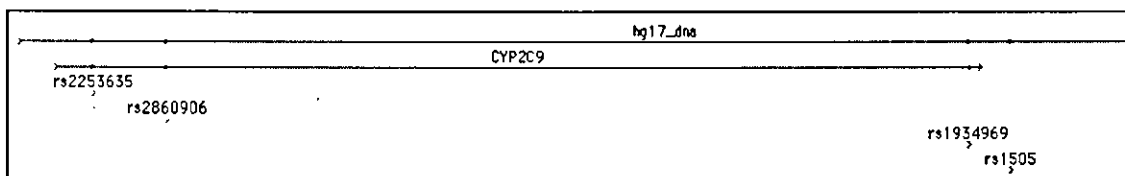


図2. CYP2C9 遺伝子と選出した SNP の位置

次に、選出した各 SNPs を含む領域を増幅するプライマーを設計し、ワーファリン投与を受けている 35 名について、各プライマー対を用いて PCR 増幅を行い直接シーケンシング法によりジェノタイピングを行った。

抽出した SNPs およびその解析の条件は以下の通りである。

PCR amplicon および primer sequence

rs2253635

GTATGGTTTGGCTGTGAACTCGTTTGTAGT
TTGAGTTTGCAAGGCAGAATAATAGGGATG
AGGTTAGTCTGTGGGCAGTTATTAGGGAAG
TTGCACTGGTAAACTTCAGGGGGTTTGAA
TGAGAAAAGCTA

C/T

GATAACAAGTGCCATGTGGCTTATGGAAAA
GTAATGAGTGATTTTAGATCAGTTTGGCAC
AGACAAAAGGAGCTTGTTATGATTATTTCTC
AAAAGGATAGTAAGAAGGAGGAATAAGCTA
TAAACTCTGTTAGGGGGTTAAGAATTAAGG
TGATTTGTATAATCCTATAGCCATCTAATTTT
AGGAGTACTGCTGTGAGGACTATTGACCTG
GCAATTGC

forward GTATGGTTTGGCTGTGAACTC
reverse GCAATTGCCAGGTCAATAGTCC

rs2860906

GGGTATTCAAATGGGAAGAGAAGAAGTCAA
ATTGTCTCTGTTTGCAGGTGACATGACTGT
ATACTTAGAAACCCATCATCTCAGCCCCAA

AACTGTTTAAGCTGATAAGCAATTCAGCA
AG

A/G

CCTCAGGATACAAAATCAATGTGCAAAAAT
AACAAGCATTCCCTATAAACCAATAATAGACA
AGCAGAGAGCCAAATCATGAGTGGACTCCC
ATTCACAATTGCTACAAAGGGAATAAAATG
CCTACTTACACAACCTTACAAGCG

forward GGGTATTCAAATGGGAAGAGAA

reverse CGCTTGTAAGTTGTGTAAGTAGGC

rs1934969

CAGTTGCCTATACATCCATCCATTCATCCAT
TTATCCATCCACTCATCCATCCATTCATTCA
TGCATGCACCCATCCACCCATCTATCTCTTC
ATCTCTTCTACGAT

A/T

CACTGAACAGTTATTGCATATTCTGTTTGTG
CCAGTTACAGAGACAGTGTGTTGTCCTGTC
ACAGTTACGCATGAGGAGTAACTGCTCTCT
GTGTTTGCTATTTTCAGGAAAACGGATTTG
TGTGGGAGA

forward CAGTTGCCTATACATCCATCCA

reverse TCTCCCACACAAATCCGTTT

rs1505

TTGGGCTCATATCACACATCTTGTATTAAAA
CTTGTATTTTTCCCTATCAAGTAATATGGCAG
CAAAACCTCTAAGGTGATAGAAACATAGGG
AAATGATT

G/C

AGAGAGATAATAGAAGAGAAAGTGGAAATG
AGTATTACATTAATGGGAAGATCCAAATGGA
AATTATACATTATACCTTTCAACCTTCTTCAT
TGGGAAATGC

forward TTGGGCTCATATCACACATCTT

reverse GCATTTCCCAATGAAGAAGG

PCR反応条件

Template DNA : 50 ng Genomic DNA

Polymerase : 0.5 U Platinum Taq

Polymerase High Fidelity, Invitrogen

PCRBuffer : Invitrogen attached buffer

Reaction Vol. : 20.0 l

Primer 1 conc.: 0.5 M (dried up in each vial)

Primer 2 conc.: 0.5 M (dried up in each vial)

MgSO4 conc. : 2mM

dNTPs conc. : 0.2 mM

Cycle program

Initial Denaturation

Denaturation: 95°C, 5:00 mins

TouchDown Cycles

Denaturation: 95°C, 0:30 mins

TD Anneal Start: 63°C, 0:30 mins

Decrement: 0.5

Extension: 68 °C, 0:30 mins

Cycles: 10

Cycling Conditions

Denaturation: 95 °C, 0:30 mins

Anneal: 58 °C, 0:30 mins

Extension: 68°C, 0:30 mins

Cycles: 26

<患者群>

小児循環器外来に受診しワーファリンの投与を受けている患者のうち内服用量が3ヶ月以上不変である31名について診療録からINR値、投与量、体重を抽出した。

<ハプロタイプ解析>

Schaidらが開発した、ハプロタイプ解析プログラムhaplo.scoreプログラムを、WindowsXPオペレーティング・システム上で使用した。haplo.scoreプログラムは、対象となる患者集団の中に存在するハプロタイプを最尤法により推定し、頻度の高いハプロタイプと被説明変数との関連を分析する。推定されたハプロタイプの頻度が0.5%未満であるハプロタイプを1群に纏めて検討した。本研究ではワーファリン投与量を被説明変数、CYP2C9座位のハプロタイプ(上記SNPの組み合わせ)を説明変数とし、INR値について補正して解析した。

解析のためのコンピュータプログラムは以下の通り。

データの読み込み

```
warf<-read.csv("warfDoseCYPover40hapscore.csv")
```

```
attach(warf)
```

検討するSNPの選択と各SNPの名前の定義

```
geno<-cbind(set.haplo(rs2253635),set.haplo(rs2253635),set.haplo(rs1505))
```

```
locus.label<-c("rs2253635","rs2253635","rs253635","rs1505")
```

以下、投与量をdose per weightをガウス変数として評価する

#体重あたりの投与量そのもので評価

```
resp<-doseperweight
```

```
hap.warf<-haplo.score(resp,geno,trait.type
```