

200400428B

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14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者：小崎健次郎

平成17(2005)年 4月

目 次

I. 総合研究報告書

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
(資料) クロバザム代謝に CYP2C19 および CYP2B6 が与える影響についての検討	高橋 孝雄...	10
(資料) 熱変成高速液体クロマトグラフィー法を用いた遺伝子多型スクリーニングシステム解析法の最適化	小崎健次郎...	25
(資料) CYP2C9 遺伝子とワーファリン維持量の関連解析	百々 秀心...	35
(資料) VKORC1 遺伝子多型とワーファリン維持量の関連性の検討	山岸 敬幸...	43
(資料) メソトレキセート投与後の副作用の発症と薬物代謝関連遺伝子多型解析	熊谷 昌明...	49
(資料) ジアゾキシドの血中濃度測定法の確立と薬物動態試験	長谷川奉延...	60
(資料) 小児科診療における効果的薬剤使用のための母集団薬物動態解析の有用性	谷川原祐介...	81
(資料) ミクロペニスにおける治療効果関連因子解析	緒方 勤...	86
(資料) 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...	91
(資料) 薬理遺伝学における倫理 —諸問題から実際の運用まで—	菅谷 明則...	96

II. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	127
-------------------------	-----

III. 研究成果の刊行物・別刷.....	130
-----------------------	-----

IV. 研究構成員名簿.....	233
------------------	-----

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)
(総括)研究報告書

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

研究要旨

クロバザム代謝に CYP2C19 および CYP2B6 が与える影響についての検討

Desmethyl N-clobazam (以下 N-CLB) は、clobazam (以下 CLB) の主たる代謝産物であって、CLB の治療効果および副作用の発生に大きな影響をもたらすと考えられている。N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度比に大きな個人差が存在することが以前から知られていた。本研究によりわれわれは CYP2C19 の多型とこれらの比率の間に遺伝子表現型の関連が存在することを示した。CYP2C19 の変異アレルを 2 コピー持つ患者においては、これらの比率は野生型を持つ患者に比べて著明に高くなり、1 コピーのみ変異アレルを持つ患者は中間的な表現型を示した。すなわちこれらの値の上昇の程度は CYP2C19 の変異アレルのコピー数に依存していた (遺伝子量効果)。N-CLB/CLB の血中濃度比は変異アレルを 2 コピー持つ患者においては、野生型の患者と比べて 6 倍の値をとっていた。したがって血中濃度の中の N-CLB/CLB の比率は、副作用の発症の可能性のある患者をスクリーニングする上で良い臨床的な指標となる。変異アレルの頻度が高い民族 (例えばアジア人では 35%) に臨床的に有用と考えられる。CYP3A4 誘導性の抗痙攣薬併用例においては、CLB 血中濃度・CLB 投与量の比率は低めになり、また N-CLB・CLB の血中濃度比は高めとなった。しかしながら CYP3A4 誘導性の抗てんかん薬の N-CLB の代謝に対する影響は小さく、我々は CYP2C19 の遺伝子型が N-CLB の血中濃度の主たる決定因子であると判断した。2004 年に *in vitro* で CYP2B6 がクロバザムの代謝に関与するとの報告がなされたので、体重あたりのクロバザム投与量により標準化したクロバザム濃度に CYP2B6 多型が与える影響を評価したが、その影響は有意ではなかった。

熱変成高速液体クロマトグラフィー法を用いた遺伝子多型スクリーニングシステム解析法の最適化

薬物代謝酵素の遺伝子検査を、臨床応用するためには、迅速・正確・低コストに、遺伝子検査を実施しうるシステムを構築する必要があるが、現在、使用されている RFLP 法や直接シーケンシング法はこれらの要件を満たしていない。本研究では、TPMT 遺伝子多型検査を診療に応用するために熱変性高速液体クロマトグラフィー法 (DHPLC 法) を用いて、高感度・高効率・低コストな遺伝子診断プロトコルを策定した。DHPLC 法による検査手法は、遺伝子上に存在する既知の多型のみならず、非常に頻度の低い多型や未知の多型を解析することが可能である。本研究では、チオプリンメチル転移酵素 (以下 TPMT) 遺伝子スクリーニング検査プロトタイプとして、臨床検査に供しうる遺伝子診断システムの開発を行った TPMT は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) を不活化される。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。TPMT 遺伝子検査により副作用を事前回避する試みが行われているが、臨床検査として TPMT 遺伝子診断を行っている施設は少ない。この原因の一つとして高感度・高効率・低コストな遺伝子診断プロトコルがまだ確立していないことが問題であった。3 年間の研究を通じて、検査プロトコルを確立し、多施設共同研究としてシステムの運用を開始した。

CYP2C9 遺伝子とワーファリン維持量の関連解析

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、臨床問題視されている。現在、ワーファリンの効果を定める重要な要素として P450 酵素 CYP2C9 が知られている。CYP2C9 遺伝子の*1*3 多型ヘテロ接合体の成人患者群におけるワーファリンの一日投与量は*1*1 ホモ接合体の患者群における一日投与量に比して低値であることが6論文報告されている。本研究ではこれらの報告のメタ解析を行い、*1*3 多型ヘテロ接合体患者に対しては、初期投与量を減量することが合理的であると考えられた。しかし CYP2C9 に存在する多型性のあるアレル、*2 は日本人においては頻度が極端に低く、*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が、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。このため、ワーファリン反応性を定める因子を新規に同定するため、更に CYP2C9 遺伝子のハプロタイプ解析を行い、4ヶ所の SNPs についてハプロタイプ構造を決定した(平成 16 年度総括研究報告「CYP2C9 ハプロタイプとワーファリン維持量の関連解析」参照)。しかしワーファリン反応性と CYP2C9 遺伝子ハプロタイプとの関連を認めず、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。この検討結果を受けて、他の候補遺伝子座位として VKORC1 多型について検討を行い、同座位の多型とワーファリンの維持用量の間に相関を示した。

VKORC1 遺伝子多型とワーファリン維持量の関連性の検討

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の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未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。1 歳から 33 歳まで(中央値 20 歳)の患者 31 名のワーファリンの投与を受けている患者(適応:人工弁・人工血管・心房細動)を対象とした。31 名の患者は思春期ないし成人の患者であり、その体重は 40kg を超えていた。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)。

メソトレキセート投与後の副作用の発症と薬物代謝関連遺伝子多型解析

メソトレキセート(methotrexate:以下 MTX)は急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia:以下 ALL)やリンパ腫など小児リンパ系腫瘍の治療に用いられる葉酸拮抗剤である。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。本研究では、MTX による副作用発症と 3 つの薬物代謝関連遺伝子の多型の関連について検討した。・葉酸代謝酵素 Methylene tetrahydrofolate reductase (以下 MTHFR) 677C/T ・葉酸を細胞内にとりこむ輸送蛋白 Reduced folate carrier 180G/A 多型 ・ABC トランスポーターC5 (ABCC5) これら 3 遺伝子の多型と大量 MTX 療法に伴う毒性発症の関連を後方視的に解析した。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、毒性を National Cancer Institute Common Toxicity Criteria によりスコア化した。因子の統計解析には generalized estimating equations 法 (以下 GEE 法) を用いた。15 例における 43 回の MTX 投与を解析対象とした。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 (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た。また 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。

ジアゾキシドの血中濃度測定法の確立と薬物動態試験

高インスリン血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、

1.HPLC によるジアゾキシド血中濃度測定法を確立した。2.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。3.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。4.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。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。

小児科診療における効果的薬剤使用のための母集団薬物動態解析の有用性

小児の適切な薬物治療のためには、小児における安全で有効な薬用量について、科学的なエビデンスを得ることが望ましい。本研究では、母集団薬物動態解析法を利用し、小児患者を対象としてエビデンスに基づいた個別投与設計を実現するために、母集団薬物動態解析法の有用性および遺伝的要素を組み込む可能性について調査した。母集団薬物動態解析の重要な利点は、複数の要因の影響を同時に検討することができること、被験者一人当りの採血回数が少数であっても、多数の被験者からデータを得ることによって解析が可能となる点である。また、既承認薬を小児に適用するにあたり、明らかとなっている成人のデータから外挿するためのブリッジングツールとしても期待できる。さらに、遺伝的要因を組み込むことにより、個人間変動を説明できれば、TDM による 1 点の測定点から血中濃度を予測でき、年齢層間で特性の異なる小児患者の初期投与設計に役立てることができる。オフラベル問題を解決し、新薬あるいは既承認薬を小児に適用するにあたり安全で有効な使用法を開発するためのモデルケースを作ることができれば、小児医療における適切な薬物治療を実現するための大きな前進と言えるであろう。

マイクロペニスにおける治療効果関連因子解析

マイクロペニスは、最も軽症の外生殖器異常で、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。TE は 5 α 還元酵素 2

型によりジドロテストステロン (DHT)に変換されたのちにアンドロゲン受容体に結合して作用する。したがって 5 α 還元酵素2型遺伝子 (SRD5A2) 変異を有する患者ではTEの治療効果は極めて乏しいと予測され、原因療法としてDHT(軟膏)投与が有効と予測される。本研究では、マイクロペニス日本人患者 81 人を対象として、SRD5A2 変異解析を行ったあと、変異の有無で層別化して対症療法としての TE (25 mg/dose) の効果と原因療法としての DHT 軟膏の効果と比較した。変異陰性患者では、TE 効果を解析した。その結果、SRD5A2 変異は、TE 治療に対する反応性を規定する因子であり、変異のある症例では、DHT 軟膏という原因治療が可能であることが明らかにされた。また、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。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。その結果、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ことを示唆する所見と推測された。

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 DNA 中に存在する A1555G ホモプラスミー変異は、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 ホモプラスミー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。

薬理遺伝学における倫理 —諸問題から実際の運用まで—

薬理遺伝学的研究や薬理遺伝学的検査の診療への応用する際には、幾つかの倫理的問題を考慮する必要がある。遺伝学的検査に関する一般的な倫理的問題とともに遺伝薬理学的検査に特有の問題点もある。本研究では、第 1 にイギリスのナッフィールド・バイオエシックス評議会 Nuffield Council on Bioethic が刊行した「Pharmacogenetics: ethical issues」について翻訳・検討を行った。薬剤開発において薬理遺伝学が果たす役割と、診療において薬理遺伝学を応用する際に考慮すべき倫理的問題について言及した章である。

新薬の開発に対し、薬理遺伝学は一定の役割を果たすことが期待される点、薬理遺伝学の診療への利用において、一般開業医(GP)や薬剤師を含む医療従事者への薬理遺伝学教育と一般人の啓蒙が不可欠である点、遺伝情報を扱うことに必ずしも慣れていない一般開業医または薬剤師が遺伝情報を保管する責務を負う点等が強調されており、これら倫理的諸問題は、継続的に検討すべき重要なテーマであった。

第 2 に、本邦における一般人の薬理遺伝学的研究に対する意識を明らかにする目的で、慶應義塾大学病院小児科一般外来を受診した患者および患者の保護者40名に対しアンケート調査を行った。本研究により、薬理遺伝学検査の結果を実際の診療に役立てるための問題を把握し、進め方を検討し、現実的な運用に近づける基盤を整備することができた。

高橋孝雄 慶應義塾大学医学部小児科 教授
谷川原祐介 慶應義塾大学医学部薬剤部 部長
百々秀心 国立成育医療センター循環器科医長
緒方勤 国立成育医療センター研究所 部長
熊谷昌明 国立成育医療センター血液腫瘍科医員
菅谷明則 都立清瀬小児病院循環器内科 医長
奥山虎之 国立成育医療センター遺伝診療科医長
長谷川奉延 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 専任講師

A. 研究目的

従来、薬物の副作用や治療効果の予見は困難であると考えられてきたが、近年の薬理ゲノム学の進歩により、薬物代謝酵素の遺伝子多型のうち、低代謝能のアレルを有する患者が、副作用を発症するリスクが高いことが明らかにされてきた。小児においては、副作用がおきた場合には重篤化する可能性が高いため、薬剤投与前に遺伝子多型スクリーニングにより副作用のリスクを予測する臨床的意義は大きい。

本研究では、主任研究者自身が開発した熱変性高速液体クロマトグラフィー法による多種遺伝子同時解析システム(特願平 11-357701)を用いて、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を構築し、薬効・副作用の発症と主要な薬物代謝酵素の遺伝子多型の関連について包括的に評価した。

B. 研究方法

小児神経病学・小児血液腫瘍学・小児内分泌学・小児循環器病学の各領域をプロトタイプとし、代表的な薬物代謝酵素の遺伝子多型と、臨床情報(年齢・体重・用量・血中濃度、薬効、副作用の発症等)と薬物代謝酵素の遺伝子多型との関連を多変量解析により評価した。評価するアウトカムにより二元配置分散分析(定常状態の血中濃度の比較)、混合効果モデル(母集団薬物動態解析)、多重回帰分析(至適用量予測)、ロジスティック回帰分析(単回投与時の副作用発症の有無)、一般化推定方程式(悪性腫瘍の化学療法等、複数回投与時の副作用発症の有無)などの統計手法を利用した。

各遺伝子の翻訳領域を中心として、遺伝子多型を同定し、患者群を対象に熱変性高速液体クロマトグラフィー法を用いてジェノタイピングをおこなった。研究実施期間中に解析した主たる薬剤とその代謝酵素の組み合わせは、① p450 酵素 CYP2C19-抗てんかん薬クロバザム、② チオプリンメチル転移酵素(TPMT)-抗白血病薬 6-メルカプトプリン、③ 5 α 還元酵素-矮小陰茎治療薬テストステロンエンアンテート、④ 還元型葉酸キャリアタンパク(RFC1)-抗白血病薬メトトレキサートである。(倫理面への配慮)

文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、厚生労働省「疫学的手法を用いた研究等に関する倫理指針」に準拠した研究計画に基づき参加施設における倫理委員会の審査を経て実施した。対象者への詳細な説明と同意に充分配慮した。ヒト検体を採取する際に、試料等提供者のプライバシーの保護、検体提供の任意性、提供を受けた検体の取り扱い方、得られる研究成果の医学的貢献度等について、試料等提供者ないしはその保護者に充分説明したうえで、文書により同意を得た。個人情報への外部への持ち出し禁止、試料等の匿名化など個人情報の保護に努めた。必要に応じて遺伝カウンセリングを提供した。

C. 研究結果

1) p450 酵素 CYP2C19 多型にもとづく抗てんかん薬クロバザムの至適用量の予測

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なためである。本研究では 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。

1.5~33 歳の 22 名のてんかん患者を対象とし、CLB・N-CLB の定常状態血中濃度を測定した。CYP2C19 の遺伝子型により、対象患者を第 1 群(*1/*1: 7 名)、第 2 群(*1/*2 または *1/*3: 10 名)、第 3 群(*2/*2 または *2/*3: 5 名)に分け、二元配置分散分析法にて検討した。血中 N-CLB/CLB 濃度比は、第 1 群: 5.4、第 2 群 10.9、第 3 群 32.6 となり、CYP2C19 遺伝子型の影響が顕著であった ($P < 0.0001$)。N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比 [(ng/mL)/(mg/kg/day)] は各群でそれぞれ 2111、5396、12836 となり、やはり変異アレル数に依存していた ($P=0.0001$)。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 の遺伝子多型により説明できることを示した。

この研究成績にもとづき、クロバザム治療前に CYP2C19 多型検査を実施し、第 3 群における初期投与量を減量して、重篤な意識障害等の副作用の回避に成功した。小児科領域におけるオーダーメイド医療の最初の事例の 1 つと考えられた。

2) チオプリンメチル転移酵素遺伝子変異スクリーニングによる造血障害発症リスクの予測

チオプリンメチル転移酵素(TPMT)は、急性リンパ芽球性白血病治療薬である 6-メルカプト

プリン(6-MP)を不活性化する酵素であり、白血病患者が遺伝子変異を有していると、6-MP 治療中に強い造血障害を来すことが知られている。治療前に TPMT 変異陽性者をスクリーニングすることができれば、造血障害の発症を予見し、用量調節が可能になると期待されてきた。しかしこれまで、高効率・高感度のスクリーニング法が開発されていなかった。

本研究では、熱変性高速液体クロマトグラフィー法を利用して、チオプリンメチル転移酵素の全翻訳領域内の遺伝子変異を同時に検出するシステムを開発した。既知の遺伝子変異(13種類)を全て検出することが可能であることを示した。白人・黒人・アジア人由来の288サンプルを解析し、新規の遺伝子変異(非同義アミノ酸置換)を2種類、同定した。日本人における遺伝子変異(*3変異)頻度は約1/20であり、*3変異を持つ患者では、造血障害が強い傾向を示した。

本研究により開発した変異解析システムを利用して、関東地区の4カ所の主要な白血病治療施設において、新規発症の急性リンパ芽球性白血病症例を対象としたTPMT遺伝子の治療前遺伝子変異スクリーニングを開始した。

3) ミクロペニスにおけるテストステロンエンテート治療効果

ミクロペニスの治療としてテストステロンエンテート(TE)の筋肉注射が行われている。TEは5 α 還元酵素2型によりジヒドロテストステロン(DHT)に変換されたのちにアンドロゲン受容体に結合して作用する。したがって5 α 還元酵素2型遺伝子(SRD5A2)変異を有する患者ではTEの治療効果は極めて乏しいと予測され、原因療法としてDHT(軟膏)投与が有効と予測される。

本研究では、ミクロペニス日本人患者81人を対象として、SRD5A2変異解析を行ったあと、変異の有無で層別化して対症療法としてのTE(25 mg/dose)の効果と原因療法としてのDHT軟膏の効果と比較した。変異陰性患者では、TE効果を解析した。3症例においてSRD5A2遺伝子変異Y26X/R227Q、G34R/R227Q、R227Q/R227Qを同定した。変異を有する3例におけるTE効果は乏しかった(0.2 cm/dose以下)が、DHT軟膏を塗布したところ、全例とも陰茎長は正常範囲内に到達した。SRD5A2遺伝子変異陰性例における陰茎長は、TE(25 mg/dose)1-4回投与により全例正常範囲内に到達した。

以上の成績から、SRD5A2変異は、TE治療に対する反応性を規定する因子であり、変異のある症例では、DHT軟膏という原因治療が可能であることが明らかにされた。

4) 葉酸代謝酵素多型とメトレキセート投与後の副作用の発症

メトレキセート(以下MTX)は急性リンパ芽球性白血病(以下ALL)やリンパ腫など小児リンパ系腫瘍の治療に用いられる葉酸拮抗剤である。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。小児ALLあるいはリンパ芽球性リンパ腫症例において、葉酸を細胞内にとりこむ輸送蛋白Reduced folate carrier 1(RFC1)80G/A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。

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・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、毒性を米国癌研究所診断基準によりスコア化した。15例における43回のMTX投与を解析対象とした。1)MTX血中濃度と各種毒性の発症、RFC1 80G/Aにおける変異アレル数と各種毒性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。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られた(Odds Ratio=0.319, P=0.034)。化学療法における副作用の重症度が患者の遺伝的背景に規定される可能性が示唆された。

D. 考察

本研究プロジェクト開始時に、以下の4点の具体的な目標を設定した。各目標についての達成度は以下の通りである。

- ① 効率的(安価かつ迅速)な遺伝子多型のルーチンの検査体制の整備→熱変性高速液体クロマトグラフィー法による遺伝子検査法を実用化し、CYP2C19・チオプリンメチル転移酵素(TPMT)・SRD5A2の各遺伝子の変異スクリーニングを、国内外より受託する体制を確立した。
- ② 薬剤使用禁忌の者(薬剤代謝酵素の機能喪失変異ホモ接合体)や用量を少なくする必要のある者(薬剤代謝酵素の機能喪失変異ヘテロ接合体)を治療前に見出し、副作用による被害を未然に防止→関東地区の主要な白血病治療施設において、6-メルカプトプリン治療前TPMT変異スクリーニングの運用を開始した。
- ③ 副作用出現時の治療コストや、ホルモン療法不応例に使用されている不必要な医療費を抑制→治療効果予測のための遺伝子検査プロトタイプとして5 α 還元酵素遺伝子検査を実用化した。
- ④ 遺伝子多型を薬物治療に生かすためのガイドラインを策定→CYP2C19遺伝子多型の変

異患者においては、クロバザムの初期投与量を通常量より減量(1/5-1/10)してスタートすることにより、意識障害等の副作用を回避しうることを示した。

「テーラーメイド医療」という概念が提唱されて数年になるが、これまで小児科臨床の現場で、治療前に薬物代謝酵素の遺伝子検査を実施し、その結果を実地診療に反映させた事例はなかった。1)に示した4つの成果は、遺伝子多型を考慮した薬物療法のプロトタイプとして学術的、社会的意義を有する。特に、また本研究で検討した遺伝子変異の一部(例:CYP2C19)は、欧米においては低頻度だが日本人を含むアジア人において比較的高頻度(15%程度)であることから、国際的にも重要な意義を持つと考えられる。

本研究においては、小児神経学領域で抗てんかん薬クロバザム投与前のCYP2C19検査の、小児血液学領域で抗白血病薬6-メルカプトプリン投与前のTPMT検査の、矮小陰茎治療薬テストステロン治療前のSRD5A2検査の意義を示し、効率的に検査を実施するシステムを確立した。今後、同様の手法が、他の小児科領域の薬剤に適用できると期待される。

E. 結論

従来の遺伝子多型と薬剤の効果に関する臨床研究は主に欧米人成人に限られていたが、成長につれて代謝経路の遺伝子発現が変化すること、遺伝子多型には大きな民族差があることから日本人小児におけるデータを収集し効率的な遺伝子多型スクリーニング検査体制を整備した。抗てんかん薬クロバザム、抗白血病薬6-メルカプトプリン、矮小陰茎治療薬テストステロン、抗白血病薬メソトレキセート、4薬剤について、各薬物の代謝酵素の遺伝子多型と副作用の発症または薬効との関連を示し、遺伝子多型スクリーニングの利用が、小児科診療における効果的薬剤使用に有用であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Udaka T, Udaka T, Torii C, Takahashi D, Mori T, Aramaki M, Kosaki R, Tanigawara Y, Takahashi T, Kosaki K. Comprehensive screening of the thiopurine methyltransferase polymorphisms by using denaturing high-performance liquid chromatography. Genetic Testing, in press.

Kosaki K, Tamura K, Sato R, Samejima H, Tanigawara Y, Takahashi T.
A major influence of CYP2C19 genotype on the steady-state concentration of

N-desmethyleclobazam. Brain Dev 26(8) 2004, 530-4.

Soneda S, Fukami M, Fujimoto M, Hasegawa T, Koitabashi Y, Ogata T.
Association of Micropenis with Pro185Ala Polymorphism of the Gene for Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor Involved in Dioxin Signaling. Endocr J 52(1) 2005, 83-8

Sasaki G, Ogata T, Ishii T, Kosaki K, Sato S, Homma K, Takahashi T, Hasegawa T, Matsuo N. Micropenis and the 5alpha-reductase-2 (SRD5A2) gene: mutation and V89L polymorphism analysis in 81 Japanese patients. J Clin Endocrinol Metab 88(7)2003, 3431-6

Ishii T, Sasaki G, Hasegawa T, Sato S, Matsuo N, Ogata T.
Testosterone enanthate therapy is effective and independent of SRD5A2 and AR gene polymorphisms in boys with micropenis. J Urol 172(1) 2004 319-24

Tatami S, Sarashina A, Yamamura N, Igarashi T, Tanigawara Y
Population Pharmacokinetics of an Angiotensin II Receptor Antagonist, Telmisartan, in Healthy Volunteers and Hypertensive Patients. Drug Metab Pharmacokinetic 18(3) 2003 203-11

Kosaki K, Tamura K, Sato R, Samejima H, Tanigawara Y, Takahashi T.
A major influence of CYP2C19 genotype on the steady-state concentration of N-desmethyleclobazam. Brain Dev 26(8) 2004, 530-4.

Soneda S, Fukami M, Fujimoto M, Hasegawa T, Koitabashi Y, Ogata T.
Association of Micropenis with Pro185Ala Polymorphism of the Gene for Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor Involved in Dioxin Signaling. Endocr J52(1) 2005, 83-8

Sasaki G, Ogata T, Ishii T, Kosaki K, Sato S, Homma K, Takahashi T, Hasegawa T, Matsuo N.
Micropenis and the 5alpha-reductase-2 (SRD5A2) gene: mutation and V89L

polymorphism analysis in 81 Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 88(7)2003, 3431-6

Ishii T, Sasaki G, Hasegawa T, Sato S, Matsuo N, Ogata T.

Testosterone enanthate therapy is effective and independent of SRD5A2 and AR gene polymorphisms in boys with micropenis. *J Urol* 172(1) 2004 319-24

Tatami S, Sarashina A, Yamamura N, Igarashi T, Tanigawara Y.

Relationship between pharmacokinetic parameters and occurrence of adverse events in clinical trials performed in Europe and United States for an angiotensin II receptor antagonist, telmisartan. *Drug Metab Pharmacokinet* 19(1) 2004 24-32

Tatami S, Yamamura N, Sarashina A, Yong CL, Igarashi T, Tanigawara Y.

Pharmacokinetic comparison of an angiotensin II receptor antagonist, telmisartan, in Japanese and western hypertensive patients using population pharmacokinetic method. *Drug Metab Pharmacokinet* 19(1) 15-23

Sasaki G, Ishii T, Sato S, Hoshino K, Morikawa Y, Kodama H, Matsuo N, Takahashi T, Hasegawa T

Multiple polypoid masses in the gastrointestinal tract in patient with Menkes disease on copper-histidinate therapy *Eur J Pediatr* 163(12) 2004

Homma K, Hasegawa T, Masumoto M, Takeshita E, Watanabe K, Chiba H, Kurosawa T, Takahashi T, Matsuo N

Reference values for urinary steroids in Japanese newborn infants: gas chromatography/mass spectrometry in selected ion monitoring. *Endocr J* 50(6) 2003

Fukami M, Horikawa R, Nagai T, Tanaka T, Naiki Y, Sato N, Okuyama T, Nakai H, Soneda S, Tachibana K, Matsuo N, Sato S, Homma K, Nishimura G, Hasegawa T, Ogata T

POR (P450 oxidoreductase) mutations and Antley-Bixler syndrome with abnormal

genitalia and/or impaired steroidogenesis: molecular and clinical studies in 10 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 90(1) 2005

Watanabe M, Sueoka K, Sasagawa I, Nakabayashi A, Yoshimura Y, Ogata T

Association of male infertility with Pro185Ala polymorphism in the aryl hydrocarbon receptor repressor gene: implication for the susceptibility to dioxins *Fertil Steril* 82 Suppl 3 2004

小崎健次郎

【遺伝子診療の現状と方向性】各遺伝子診療部の取り組み 慶応義塾大学における取り組み *SRL宝函* 28巻2号 2004

小崎健次郎

【遺伝学はゲノム情報でどう変わるか ポストゲノム時代を展望する】ゲノム情報と医療 ゲノム情報で医療はどう変わるのか *生物の科学 遺伝 別冊* 15号 2002

小崎健次郎,佐藤玲子,谷川原祐介

【小児薬物療法に関する最近の話題】安全で効果的な小児薬物療法の展望 *小児科* 44巻9号 2003

島崎紀子, 森鉄也, 吉原宏樹, 嶋田博之, 小崎健次郎, 高橋孝雄

6MP,MTXによるALL維持療法における休薬期間とTPMT,MTHFR多型の関連 *日本小児血液学会雑誌* 18巻4号 2004

小崎健次郎, 田村和代, 佐藤玲子, 谷川原祐介, 高橋孝雄

CYP2C19変異によるクロバザム活性中間体(N-デスメチルクロバザム)定常状態血中濃度の変動 脳と発達 36巻 2004

島崎紀子, 森鉄也, 嶋田博之, 小崎健次郎, 高橋孝雄

メトトレキサート関連肝障害とMTHFR C677T多型 *日本小児科学会雑誌* 108巻2号 2004

小崎健次郎, 前山克博, 菅谷明則, 百々秀心, 山岸敬幸, 高橋孝雄

CYP2C9*3ヘテロ接合体患者におけるワーファリン投与量のメタ解析

日本小児科学会雑誌 108 巻 2 号 2004

島崎紀子, 森鉄也, 嶋田博之, 木下明俊, 小崎健次郎, 高橋孝雄

メトトレキセート関連急性毒性と薬物血中濃度・個体差の関連 日本小児血液学会雑誌 17 巻 4 号 2003

佐藤玲子, 谷川原祐介【臨床に活かす PK/PD 薬物の体内動態と薬効・毒性】

抗菌薬の PK/PD

医薬ジャーナル 41 巻 1 号 2005

古道一樹, 林拓也, 仲澤麻紀, 土橋隆俊, 福島裕之, 山岸敬幸

ワーファリン内服中, 止血困難な鼻出血を呈した CYP2C9*3 ヘテロ保因者

日本小児循環器学会雑誌 20 巻 3 号 2004

曾根田瞬, 藤本昌敏, 佐々木理恵, 長谷川奉延, 松尾宣武, 深見真紀, 緒方勤

男児外陰部異常症とダイオキシシン アリールハイドロカーボン受容体(AHR)遺伝子と AHR 抑制因子遺伝子多型の相関解析

日本小児科学会雑誌 108 巻 4 号 2004

古山順一, 黒木良和, 千代豪昭, 藤田潤, 福嶋義光, 左合治彦, 松原洋一, 奥山虎之

遺伝子医療の基盤整備に関する研究(II)

日本遺伝カウンセリング学会誌 25 巻 1 号 2004

三原喜美恵, 田村智英子, 斉藤理恵子, 奥山虎之

国立成育医療センターにおける遺伝カウンセリング 医療 57 巻増刊 2003

奥山虎之, 小崎里華, 福原康之

わが国における遺伝子医療の現状

日本臨床 63 2005

2. 学会発表

Kosaki K, Udaka T, Samejima H, Fujita H, Yahagi N, Takahashi T. The COPPER plate system: Effective use of DHPLC for clinical genetics and pharmacogenetics. American College of Medical Genetics Annual Meeting, March 2004, Orlando, Florida.

Kosaki K, Tamura K, Sato R, Samejima H, Tanigawara Y, Takahashi T. A major influence of

cytochrome 2C19 genotype on the steady-state concentration of Ndesmethylclobazam. The 9th Conference of the European Society of Developmental, Perinatal & Paediatric Pharmacology. June 2004, Marburg, Germany.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特願平 11-357701 変異型DNAを迅速に検出するキット。

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)
総合研究報告書

クロバザム代謝に CYP2C19 および CYP2B6 が与える与える影響についての検討
分担研究者 高橋孝雄 (慶應義塾大学医学部小児科 教授)

研究要旨 Desmethyl N-clobazam (以下 N-CLB) は、clobazam (以下 CLB) の主たる代謝産物であって、CLB の治療効果および副作用の発症に大きな影響をもたらすと考えられている。N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度比に大きな個人差が存在することが以前から知られていた。本研究によりわれわれは CYP2C19 の多型とこれらの比率の間に遺伝子表現型の関連が存在することを示した。CYP2C19 の変異アレルを 2 コピー持つ患者においては、これらの比率は野生型を持つ患者に比べて著明に高くなり、1 コピーのみ変異アレルを持つ患者は中間的な表現型を示した。すなわちこれらの値の上昇の程度は CYP2C19 の変異アレルのコピー数に依存していた (遺伝子量効果)。N-CLB/CLB の血中濃度比は変異アレルを 2 コピー持つ患者においては、野生型の患者と比べて 6 倍の値をとっていた。したがって血中濃度の中の N-CLB/CLB の比率は、副作用の発症の可能性のある患者をスクリーニングする上で良い臨床的な指標となる。変異アレルの頻度が高い民族 (例えばアジア人では 35%) に臨床的に有用と考えられる。CYP3A4 誘導性の抗痙攣薬併用例においては、CLB 血中濃度・CLB 投与量の比率は低めになり、また N-CLB・CLB の血中濃度比は高めとなった。しかしながら CYP3A4 誘導性の抗てんかん薬の N-CLB の代謝に対する影響は小さく、我々は CYP2C19 の遺伝子型が N-CLB の血中濃度の主たる決定因子であると判断した。2004 年に *in vitro* で CYP2B6 がクロバザムの代謝に関与するとの報告がなされたので、体重あたりのクロバザム投与量により標準化したクロバザム濃度に CYP2B6 多型が与える影響を評価したが、その影響は有意ではなかった。

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
佐藤 玲子 慶應義塾大学医学部薬剤部 助手
田村 和代 慶應義塾大学医学部小児科 医師
鮫島 葉月 慶應義塾大学医学部小児科 研究員

A.研究目的

CLB はベンゾジアゼピン系の抗痙攣薬であり、しばしば他の抗痙攣薬と併用されている。N-CLB は CLB の主たる代謝産物であり、血中濃度が長く、定常状態における血中濃度はその親化合物である CLB に比べても極めて高いので、CLB 治療

における効果や副作用の発症に大きな影響を与える。したがって親化合物である CLB だけではなく、この代謝産物である N-CLB の血中濃度も合わせて常に測定すべきであると推奨されている。この点において N-CLB の血中濃度と体重当たりの CLB 投与量の比率に非常に大きな個人差があることは特記すべきことである。同じように N-CLB/CLB 血中濃度比にも大きな個人差が認められている。

N-CLB 濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度比の個人差は、部分的に併用薬の影響として説明されている。特にフェノバルビタール・カルバマゼピン・フェニトインといった薬を併用

している患者でこの影響が認められている。これらの薬を併用すると CYP3A4 が誘導される。CYP3A4 は CLB を N-CLB に代謝する薬であるので、N-CLB/CLB 比は上昇する。しかしながら CYP3A4 を誘導する効果のある薬を併用していない症例においても、血中の CLB の初期投与量から N-CLB 濃度を予測することは難しい。

最近、CYP2C19 の阻害剤であるフェルバメート併用患者において N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度の比が上昇することが示され、N-CLB の代謝に CYP2C19 が関与する可能性が示唆された。また N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度比が上昇しているイタリア人 2 症例が報告され、2 名のうちの 1 名は CYP2C9 の変異アレルホモ接合体、1 人はヘテロ接合体であった。

CYP2C19 の第 5 エクソン内のグアニンからアデニンへの単塩基置換はスプライス部位の変化を起こし mRNA の reading frame をシフトされる。この結果、第 215 番目アミノ酸以降から読み枠がずれて 20 アミノ酸後方においてストップコドンを生ずる。この変異を P450 変異アレルの国際記名法では*2 アレルと称する。CYP2C19 の第 4 エクソン内の第 636 塩基におけるグアニンからアデニンへの単塩基置換もストップコドンを生ずる。この変異を*3 アレルと称する。CYP2C19 の*2 および*3 アレルはともに機能を持たないタンパクを生成する。*2 および*3 の変異アレルの頻度には人種間差が存在することが知られている。

*2 アレルと 3 アレルを組み合わせたアレル頻度は日本人において 35% と特に高い上、*2 と*3 アレルにより日本人における低代謝能者 poor metabolizer のほとんど全員を説明しうる。これに対して、*2 アレルと*3 アレルを組み合わせたアレル頻度は白人においては 20% である。本研究では、上掲のごとき日本人の特殊な人口構成に着目し、CYP2C19 の遺伝子型の N-CLB および CLB の代謝に対する影響を検討した。

(*1/*1: 7名)、第2群(*1/*2または*1/*3:10名)、第3群(*2/*2または*2/*3:5名)に分け、二元配置分散分析法にて検討した。血中N-CLB/CLB濃度比は、第1群: 5.4、第2群10.9、第3群32.6となり、CYP2C19遺伝子型の影響が顕著であった (P<0.0001)。N-CLB血中濃度/CLB投与量比 [(ng/mL)/(mg/kg/day)] は各群でそれぞれ2111、5396、12836となり、やはり変異アレル数に依存していた (P=0.0001)。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。

しかしながら、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)。CYP3A4 や CYP2B6 の多型によって CLB の薬物動態の個人差を説明できる可能性が予想される。

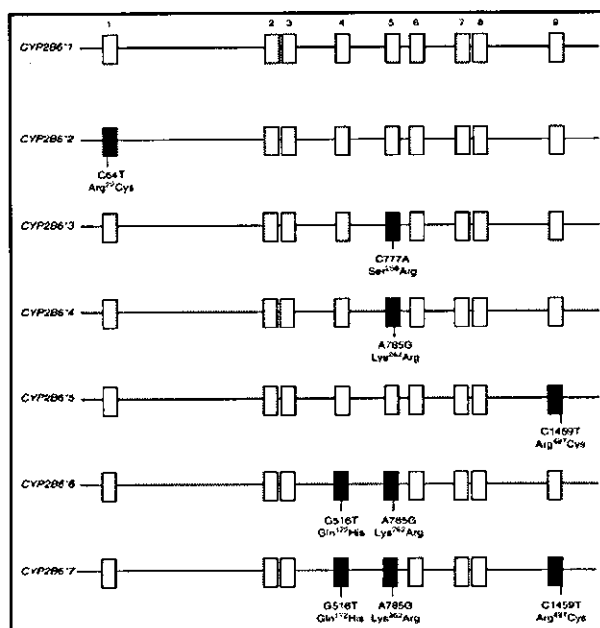


図 1. CYP2B6 遺伝子の遺伝子多型

CYP2B6 遺伝子は約 27kb、9 つのエクソンから構成されている。この遺伝子中には多くの遺伝子多型が存在する（図 2 および <http://www.imm.ki.se/CYPallels/> 参照）。最近の Iwasaki らの報告によれば、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。また、Jinnno らの報告によれば、第 262 アミノ酸リジンがアルギニンに置換されている場合 Lys262Arg 多型について、Lys262 多型の活性は上昇している。

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 か所について、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。

B. 研究方法

1) CYP2C19 に関する検討

慶應義塾大学病院小児神経外来に通院中の 1.5 歳から 33 歳（中央値 7 歳）の 16 名のてんかん患者を対象とした（表 1）。全ての患者は CLB 錠剤ないし顆粒製剤（大日本製薬マイスタン）を経口投与されていた。少なくとも 4 週間、処方量に変化のない患者を対象とした。6 名中 16 名は基礎神経疾患（硬膜下血腫、脳内出血、髄膜脳炎、巨脳症、神経線維腫症、脳膿瘍）を有していた。全ての患者は CLB の他の抗痙攣薬を併用していた。7 名の患者は少なくとも 1 剤の CYP3A4 誘導性抗痙攣薬（フェノバルビタール・カルバマゼピン・フェニトイン）を内服しており、一方 9 名の患者は CYP3A4 非誘導性の抗痙攣薬（バルプロ酸・エドサクシミド・ゾミサミド）を内服していた。

CLB と N-CLB の血中濃度はガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー法によって測定された。本研究では 1 点において採血した血中濃度を定常状態の血中濃度であると仮定した。というのは CLB の投与後、4 日以内に CLB の血中濃度は定常状態に達し、10 日以内に N-CLB の血中

濃度も定常状態に達することが以前の研究で知られているからである。この研究プロトコルは院内の倫理委員会により承認され、全ての参加患者あるいはその両親は書面にてインフォームド・コンセントを提出している。キアゲン社の脱塩カラムを用いて全血からゲノム DNA を抽出した。CYP2C19 の*2 および*3 アレルを PCR 法により増幅し、PCR 産物は自動シーケンサー (ABI3100) または熱変成高速液体クロマトグラフィー (トランスジェノミック社 WAVE) 法を用いて解析した。CYP2C19 の*2 アレルと*3 アレルはともに蛋白の機能を消失させることから両者のプアメタボライザ表現型に対する寄与は同程度であると判断した。そこで患者を変異アレルの総数によって以下のごとくに分類した。

グループ 1 : CYP2C19*1*1

グループ 2 : CYP2C19*1*2 または

CYP2C19*1*3

グループ 3 : CYP2C19*2*2, CYP2C19 *3*3,

CYP2C19*2*3

さらに患者を CYP3A4 誘導性の抗痙攣薬の併用の有無によっても分類した。反応変数として CLB 血中濃度/CLB 投与量比、N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比、N-CLB 血中濃度/CLB 血中濃度比を採用し、二元配置分散分析法によってその差を比較した。

2) CYP2B6 に関する検討

① ジェノダイピング

CYP2B6 遺伝子多型*2、*4、*6 はそれぞれ CYP2B6 遺伝子のエクソン 1、4、5 に位置している。CYP2B6 遺伝子は CYP2B7 遺伝子のゲノム配列ときわめて相同性が高いため、exon 1、4 に関しては論文に記載されているプライマー (Lamba.et.al., 2003) を用い、exon5 に関しては UCSC ゲノム・ブラウザー (<http://genome.cse.ucsc.edu/>) から CYP2B6 および CYP2B7 遺伝子のゲノム配列を入手し、BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>)

において相同性検索を行い、exon 5 を特異的に増幅する PCR プライマーを設計した。

解析の条件は以下の通りである。

PCR amplicon 及び primer sequence

exon1 449bp

GCTAATGCTCCTGGATGATGATGAAAAAGG
AGGTGGGGAATGGATGAAATTTTATAACAG
GGTGCAGAGGCAGGGTCAGGATAAAAGGC
CCAGTTGGAGGCTGCAGCAGGGTGCAGGG
CAGTCAGACCAGGACCATGGAACCTCAGCGT
CCTCCTCTTCTTGCCTCCTCACAGGACT
CTTGCTACTCCTGGTTCAGCGCCACCCTAA
CACCCATGACCGCCTCCACCAGGGCCCCG
CCCTCTGCCCCTTTTGGGAAACCTTCTGCA
GATGGATAGAAGAGGCCTACTCAAATCCTT
TCTGAGGGTAAGACACAGACGAATGGGGTC
TGAGGGTGAGCTGCTTCTTGCCTTGGTACT
TGGGGAAGCTTCACCAAACAGAATGAGGCA
GACTTCCAGAGTCAGGGGTGGCACGGGCA
TGGTTGGTGAGTACGGAGCATGGTGAAGCA
TG

forward GCTAATGCTCCTGGATGATG

reverse CATGCTTCACCATGCTCC

exon4 526bp

GGTCTGCCCATCTATAAACTGGAGCTAATAA
TCAAATTGCATCTGCCTCACATTGTTGTAGT
GAGAGTTCAATGGAATTACGCGTGACGTGC
TGGTACATAATTAGCTGTTACGGTTATTCTC
ATGTTTACCATTACTGAGTGATGGCAGACA
ATCACACAGAGATAGGTGACAGCCTGATGT
TCCCCAGGCACTTCAGTCTGTGTCTTGAC
CTGCTGCTTCTTCTAGGGGCCCTCATGGA
CCCCACCTTCTTCTCCAGTCCATTACCGC
CAACATCATCTGCTCCATCGTCTTTGGAAA
ACGATTCCACTACCAAGATCAAGAGTTCCT
GAAGATGCTGAACTTGTCTACCAGACTTT

TTCACTCATCAGCTCTGTATTTCGGCCAGGT
CAGGGAGACGGAGAGGGACAGGGGGTGTG
GGGGTGAGGTGAACACCCAGAACACACGA
GAAAAGGATGACCTGTCTTGGGGGCTCAGA
AATGCAGCTTATCCTTGGGAAGAAACGCAGA
CATGTGAAGAATCAG

forward GGTCTGCCCATCTATAAAC

reverse CTGATTCTTCACATGTCTGCG

exon5 969bp

GAAGGAAATTTACATCTGACTATATATGTTT
GCATTTTTTGCAATTATTTGCAATAAATTAGG
CATTCCATTCTTCATCAAAGTAATAGAAATA
ACCTCCAAAATACGTAGTCTAACATGTCA
GCAGGCTTATCTTGTGTAAGAATCATTTTAT
TAATATCTGACACAGCAAGGGAGATGAGGA
GAGGTGGGAAGAGGGAGAGAAAAGTATGA
GAAAGACAAATAAACAGGCTGAGGTAGACA
ATGGGTGACACAGAAAGGAAGTGAGACAG
AGACTAAGAGAGATAGAAAGGAGAGAGGC
AGGGAGATGGGGCAGAGGCCAAGAAAAAG
ACAGAAGGATGAGGGAGGAAGATGCAGAA
AGAGGTAAATGTGAGATAGATCAAAGGAGA
TATAGAGTCAGTGAGTGAGGGGTTTCAGAGG
CAGAGGGGAGTGGGGAAGTGGGGTTCCCA
TGGAGGGATTGGGGCCCAGGAGGCGCTCT
CTCCCTGTGACCTGCTAGCTCAGCCCTAGG
CAAACCTCACCACCCCTTCTTTCTTGCAGC
TGTTTGAGCTCTTCTCTGGCTTCTTGAATA
CTTTCCTGGGGCACACAGGCAAGTTTACAA
AAACCTGCAGGAAATCAATGCTTACATTGG
CCACAGTGTGGAGAAGCACCGTGAAACCCT
GGACCCAGCGCCCCCAAGGACCTCATCGA
CACCTACCTGCTCCACATGGAAAAAGTGGG
GTCTGGGAGAGGAAAAGGGAAGGGAGGG
GAGGGAGGGCAAGATGGAGAGGTGAGAAG
AGGGAGGGAAAAGGGGTAGGGAAGGGGAA
GATGGGGAGGGAAGAAGAAAGACTAGGGA

GGGGAGAATAGGGAAAGGGAGGAGAGAAC
ATGAGGAAGGAAAGAAAGATGAGGTGAAA
GGAGGGAGAAAATAGGGAGGAGGAACTGA
GACAGGGAGAGAGGGGAGGTGGGAAGACA
GAATGAAAGACAGAGGGAG

forward GAAGGAAATTTACATCTGAC
reverse CTCCCTCTGTCTTTCATTCTG

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 °C

Extension: 68 °C, 1:00 mins

Cycles: 10

Cycling Conditions

Denaturation: 95 °C, 0:30 mins

Anneal: 58 °C, 0:30 mins

Extension: 68 °C, 1:00 mins

Cycles: 26

<CYP2C19>

平成 15 年度の報告以降研究を継続、34 名中 18

人について新たにジェノタイピングを行った。

CYP2C19*2(681G>A)

forward AATTACAACCAGAGCTTGGC

reverse CTTCTCCATTTTGATCAGGA

Initial Denaturation

Denaturation: 95 °C, 5:00 mins

Cycling Conditions

Denaturation: 95 °C, 0:30 mins

Anneal: 58 °C, 0:30 mins

Extension: 68 °C, 0:30 mins

Cycles: 35

Final Extension: 68 °C, 10:00 mins

②クロバザム投与量とクロバザム血中濃度の関連

多重回帰モデルにより変異アレルの個数と CLB 血中濃度の関係を評価した。この際に、体重あたりのクロバザム投与量で補正をおこなった。

C.研究結果

1) CYP2C19 に関する検討

各遺伝子型に属した患者数は以下の通りであった。

CYP2C19*1*1 : 7 名、CYP2C19*1*2 : 4 名、

CYP2C19*1*3 : 2 名、CYP2C19*2*2 : 2 名、

CYP2C19*3*3 : 0 名、CYP2C19*2*3 : 1 名

よってグループ 1 に属する患者は 7 名、グループ 2 に属する患者は 6 名、グループ 3 に属する患者は 3 名であった。

3 グループにおいて患者の背景因子（年齢、性別、体重、投与量、体重の比率）に有意な差を認めなかった（表 1）。CLB 濃度と N-CLB の濃度を CLB の体重あたりの投与量によって平準化した（図 1）。CLB 血中濃度/CLB 投与量比の平均値はグループ 1、2、3 においてそれぞれ 443, 819, and 457 ng/ml/mg/kg/day であった（図 1A）。

N-CLB の血中濃度/CLB 投与量比の各グループの値は 2111, 7156, 13504 ng/ml/mg/kg/day であった。したがって CYP2C19 変異アレルの数は N-CLB の血中濃度・CLB 投与量比に影響を与えていた。CYP2C19 変異アレル数は CLB 血中濃度/CLB 投与量比に影響を与えていなかった。N-CLB/CLB 血中濃度比は変異アレル数に依存して増加していた。これらの成績は遺伝子量効果 gene dosage effect を示していた (図 2)。

グループ 1~3 において CYP3A4 誘導性の抗癌薬の併用患者は CLB 血中濃度/CLB 投与量比が低めであり N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比が低めであり、N-CLB/CLB 血中濃度比が高い傾向が認められた (図 2)。そこで CYP3A4 誘導性併用薬併用患者と非併用患者の間における CLB 血中濃度/CLB 投与量比、N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比、N-CLB/CLB 血中濃度比の差を 2 次元配置分散分析により比較した。CLB 血中濃度/CLB 投与量比は変異アレル数によらず、不変であったが ($p=0.63$)、3A4 誘導性抗癌薬の併用群において有意に低下していた ($p=0.005$)。N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比は変異アレル数に大きく依存しており ($p<0.0001$)、CYP3A4 誘導性薬剤の併用群において著明に低下していた ($p=0.001$)。N-CLB/CLB 血中濃度比も変異アレル数に依存しており ($p<0.0001$)、CYP3A4 誘導性の抗癌薬剤の併用群において著明に増加していた ($p=0.004$)。

2) CYP2B6 に関する検討

解析の結果、exon 1、4、5 それぞれを増幅する Primer 対を設計し、実際に設計した Primer 対で標的配列が増幅出来ていることを確認した。また各 exon を同一条件下で増幅することが可能であった。

また、これらの検討から、日本人における各ハプロタイプのアレル頻度および、各遺伝子型の頻度は表 1 に示す如くとなった。

表 1・CYP2B6 におけるジェノタイプ頻度

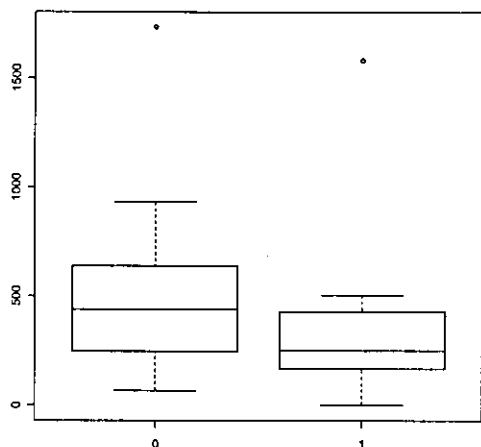
Genotype	No.of individuals (total 34)
*1/*1	19
*1/*2	1
*1/*4	2
*1/*6	7
*2/*4	2
*2/*6	1
*4/*4	1
*6/*6	1

haplotype	allele (total 34)	%
1	CGA	75%
2	CTG	13%
3	CGG	5%
4	TTG	1%
5	TGG	3%
6	TGA	3%

クロバザム投与量とクロバザム血中濃度の関連多重回帰モデルにより変異アレルの個数と CLB 血中濃度の関係を評価した Gln172His、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。

1) Gln172His

横軸に His172 アレル数、縦軸に体重あたりのクロバザム投与量により標準化した CLB 濃度をプロットした。



His172 を 1 個持つ群 (すなわち Gln/His ヘテロ接合体)の方が、Gln/Gln ホモ接合体群に比して、体重あたりのクロバザム投与量により標準化した clb 濃度が低い傾向が認められたが統計的には有意ではなかった。2 名の outlier がいたが、その原因は不明であった。outlier を除いた解析結果は不変であった。

統計モデル：

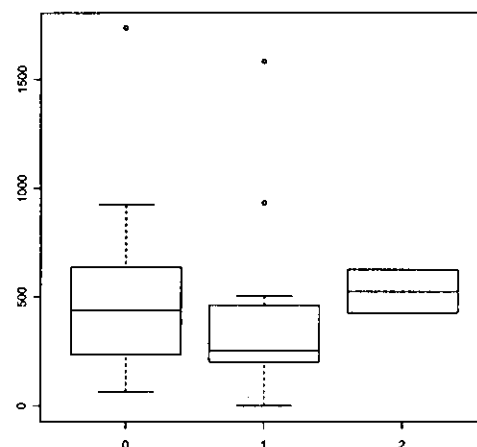
体重あたりのクロバザム投与量により標準化した clb 濃度 ~ His アレル数 + CYP3A4 誘導薬の併用の有無

His アレル数： p 値

CYP3A4 誘導薬の併用の有無：

2) Lys262Arg

横軸に Arg262 アレル数、縦軸に体重あたりの clb 濃度をプロットした。



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 がいたが、その原因は不明であった。outlier を除いた解析結果は不変であった。

D. 考察

本研究においてわれわれは CYP2C19 の多型 (*2 多型と*3 多型) と N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度比について遺伝子型と表現型の関連を示した。変異アレルを 2 コピー持つ患者では野生型の患者に比べて N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度比はともに著明に上昇していた。変異アレルを 1 コピー持つ患者群は両者の中間的な性質を示していた。これらの成績は CYP2C19 が N-CLB の分解に関わることを示唆する所見であった。

各グループの患者が CYP3A4 を誘導する薬を併用していたがどうかによって区分した際には、併用患者において CLB 血中濃度/CLB 投与量比は低値である、N-CLB/CLB 血中濃度比は高値であった。これらの変動は併用薬により CYP3A4 が誘導された結果、CLB から N-CLB への代謝が亢進したためであると理解される。しかし CYP2C19 の多型の方が、CYP3A4 誘導性の薬剤よりも、N-CLB 代謝に大きな影響を与えていた。以上の

成績から、CYP2C19 の遺伝子型が N-CLB の定常状態における血中濃度の主要な決定因子であると結論した。

N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比の値が変異アレルを 2 コピー有する患者において、変異アレルを持たない患者の 6 倍であったことは、臨床的な観点から重要である。N-CLB の抗癌薬効果は CLB の 1/4 程度であることが報告されているが、変異アレルを 2 コピー有する患者において N-CLB の血中濃度が著明に上昇しており、これらの患者が N-CLB あるいは CLB の副作用を受けやすい可能性が示唆された。実際に変異アレルを 2 コピー有する患者の 1 人は標準的な量の CLB の投与を受けていたにも関わらず、CLB の副作用として知られる強い眠気を訴えた。今後、規模な前向き研究によって CYP2C19 の変異アレルを 2 コピー有する場合に CLB の副作用を起こしやすいかどうか、さらなる検討が必要である。血中の N-CLB/CLB の投与量比は CYP2C19 の多型を推定する上で有用なパラメーターになりうると考えられた。変異アレルを 2 コピー有していた 3 人の N-CLB/CLB 血中濃度比は全て 25 以上であった。CLB 治療の投与開始直後において CLB 投与量比を測定すれば、副作用を発症する可能性のある人間を予測することができるかと期待できる。このような注意はアジア人のように CYP2C19 変異アレルの頻度が高い人口集団においては特に臨床的に意味があると考えられる。ただし CYP3A4 誘導性の抗癌薬を併用している者においては変異アレル数が 1 コピーの患者でも N-CLB/CLB 血中濃度比が上昇しうることを考慮すべきである。

N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比の上昇の程度と N-CLB/CLB 血中濃度比の上昇の程度は CYP2C19 の変異アレル数に依存していた。このような遺伝子量効果は、クロバザムと同様に CYP2C19 によって代謝されるオンペラゾール（プロトンポンプ阻害剤）の研究成績とよく類似している。オンペラゾールによってヘリコバクター・ピロリ感染症を随伴する胃潰瘍を治療する

際に、CYP2C19 の変異アレルを 2 コピー有する患者あるいは 1 コピー有する患者においてより治療効果が高いことが示されている。このような治療効果の増大は血中濃度の上昇と関連していると考えられている。CLB 治療においても、オンペラゾールのように、CYP2C19 の変異アレル数と治療効果の関連についても、遺伝子量効果が認められるかどうか検証する必要がある。

本研究について検討を要する事項が 2 点ある。まず、CLB と N-CLB の血中濃度は単点測定の結果であった、複数の測定点によって検証されたものではない点が上げられる。より正式な母集団薬物動態学的な検討によって患者の CYP2C19 の遺伝子型が N-CLB の血中濃度にどのような影響を与えるか評価が必要である。次に患者は*2*3 アレルについてのみ検討を行われ、その他の CYP2C19 の変異があったかどうかについては検討していない点があげられる。したがって本研究において*2 あるいは*3 のヘテロ接合体であると判断された者が実際には他の変異アレルも持っている複合ヘテロ接合体であるという可能性も理論的には考えられる。しかし日本人以外の*2*3 アレル頻度が非常に低いという結果を参考にすればこのような心配は主に理論的なものであると考えられる。

本研究で示されたように、新しい抗癌薬の評価を行う際には薬物代謝酵素の遺伝子多型が重要な攪乱因子であることを認識すべきであり、当該薬剤ばかりでなく当該薬剤の代謝産物が多型性のある薬物代謝酵素により代謝される場合にも十分な注意が必要である。また、薬物代謝酵素の多型に大きな民族差が存在しうることを勘案すると、特定の民族集団において得られた薬物臨床試験の成績を他の地域に外挿して承認申請する場合に、十分な注意が必要である。最後に我々はてんかんやその他の慢性疾患の薬物療法をより良いものとするためには CYP 酵素の多型と当該薬剤の薬物代謝および薬物動力学についての関係を十分に確立することが重要であるという

点を強調したい。

2004年に *in vitro* で CYP2B6 がクロバザムの代謝に関与するとの報告がなされたので、体重あたりのクロバザム投与量により標準化したクロバザム濃度に CYP2B6 多型が与える影響を評価した。まず、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 誘導性抗け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。

E. 結論

Desmethyl N-clobazam は、抗てんかん薬 clobazam の主たる代謝産物であって、clobazam の治療効果および副作用の発生に大きな影響をもたらすと考えられている。N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度比に大きな個人差が存在することが以前から知られていた。本研究によりわれわれはこれらの比率の個人差が CYP2C19 の多型により説明できることを示した。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。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

A major influence of CYP2C19 genotype on the steady-state concentration of N-desmethyloclobazam.

Kosaki K, Tamura K, Sato R, Samejima H, Tanigawara Y, Takahashi T. *Brain Dev.* 2004 Dec;26(8):530-4.

H. 参考文献

- [1] Bun H, Coassolo P, Gouezo F, Serrandimigni A, Cano JP. Time-dependence of clobazam and N-demethylclobazam kinetics in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1986;24:287-293.
- [2] Shorvon SD. Benzodiazepines: Clobazam. In: Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, editors. *Antiepileptic drugs*. New York: Raven Press; 1995. p. 763-777.
- [3] Nakamura F, Suzuki S, Nishimura S, Yagi K, Seino M. Effects of clobazam and its active metabolite on GABA-activated currents in rat cerebral neurons in culture. *Epilepsia* 1996;37:728-735.
- [4] Bun H, Monjanel-Mouterde S, Noel F, Durand A, Cano JP. Effects of age and antiepileptic drugs on plasma levels and kinetics of clobazam and N-desmethyloclobazam. *Pharmacol Toxcol* 1990;67:136-140.
- [5] Sennoune S, Mesdjian E, Bonneton J, Genton P, Dravet C, Roger J. Interactions between clobazam and standard antiepileptic drugs in patients with