

患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及び メタボロミクス的手法の開発に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部
研究者 齋藤 嘉朗

研究要旨 2種の代謝酵素遺伝子の多型につきインビトロ機能解析を行い、機能低下または機能影響の基質特異性を明らかにした。4種の遺伝子につき、タイピング系の開発・評価を行った。CYP3Aの活性指標と成り得る尿中バイオマーカーを探索するため検討を進めた。

分担研究者

- (1) 東洋紡績(株)敦賀バイオ研究所 宝田 裕
- (2) 第一化学薬品(株)診断薬研究所 森 篤雄
- (3) 三菱ウェルファーマ(株)創薬本部研究部門
薬物動態研究所 丹羽 卓朗
- (4) ファイザー(株)中央研究所 岩崎 一秀

遺伝子の多型につきインビトロ機能解析を遂行・開始した。また4種の代謝酵素・トランスポーター遺伝子につき、タイピング系の開発・評価を行った。また尿中におけるCYP3Aの活性指標と成り得るバイオマーカーを探索する目的で、肝臓におけるCYP3Aの発現レベルを直接測定できるラットを対象に検討を進めた。

A. 研究目的

薬物に対する生体の反応性(薬物応答性)に関しては、個体差や人種差があることがよく知られている。薬物動態関連分子をコードする遺伝子の多型によりもたらされる薬物代謝酵素等の機能変化は、薬物の血中濃度の過度の低下や上昇を招き、個体差発現の原因となりうる。既に多数の遺伝子多型が薬物動態関連遺伝子において報告されているものの、機能変化が明らかにされているものは非常に少ない。本研究では、遺伝子型タイピングの対象とすべき遺伝子多型を明らかにする目的で、薬物の有効性および副作用発現に影響を及ぼす薬物代謝酵素及びトランスポーター等の遺伝子多型を、特に基質特異性の観点から、インビトロ機能解析系を用いて明らかにする。また、同時に、これら遺伝子多型の一斉タイピング系を開発する。さらに、遺伝子多型による予測が困難な場合の薬物応答性の個体差を予測する目的で、メタボロミクス的手法も取り入れて、環境要因により変化する薬物動態指標となるバイオマーカーを明らかにする。本研究の遂行により、患者毎の薬物代謝酵素及びトランスポーターの活性予測が容易となり、個人の体質に見合った適切な医薬品の選択・投与量の決定のための重要な情報を得ることが可能となる。

具体的には、今年度は2種のチトクロム P450

B. 研究方法

①遺伝子多型のインビトロ機能解析

1) CYP1A2

ベクターに組み込んだ野生型 *CYP1A2* cDNA を鋳型として、3種の塩基置換を導入した。プラスミドを調製後、配列確認を行った。ハムスター繊維芽細胞株 V79 細胞へのトランスフェクションは 10cm dish にて 70-90%コンフルエントとなった V79 細胞につき、7 µg のプラスミドを用いて行った。37°C にて 4 時間インキュベーション後、3 倍容の 6.7% FCS を含む DMEM 培地を加え、さらに 24 時間インキュベートした。細胞を氷冷した PBS (pH 7.4) にて洗浄後、スクレーパーにて剥がし、ホモジナイズして破碎した。4°C にて 9,000 g x 10 分間遠心後の上清を、さらに 105,000 g x 1 時間遠心し、その沈殿を 10% Glycerol を含む 50 mM Kpi-buffer (pH 7.4) に懸濁しマイクロソーム画分とした。また、別途、mRNA 定量のため全 RNA 画分を調製し、さらに DNase I 処理した。

mRNA レベルの定量は、逆転写後、TaqMan gene expression assay (Hs01070371_g1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) により行い、TaqMan Rodent GAPDH Control 試薬により定量した Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA レベルで補正した。

蛋白質レベルの定量は、既報 (Murayama N. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 308, 300-306 (2004)) の通り行った。

活性測定は CYP1A2 の典型的基質である 7-ethoxyresorufin につき行った。即ち、ミクロソーム画分、種々の濃度の 7-ethoxyresorufin を含む 50 mM Kpi buffer (pH7.4) を 37°C で 1 分間加温した後、1 mM NADPH を加え、さらに 30 分間インキュベートした。同量の氷冷メタノールを加えて攪拌後、12,000 x g で 20 分間遠心した。その上清をフィルター濾過し高速液体クロマトグラフィーによる分析に供した。分析に用いたカラムは Inertsil ODS-80A (GL サイエンス社)、カラム温度は 30°C で、0.7 ml/分の流速で 20 mM リン酸バッファー (pH 6.8) / アセトニトリル / メタノール (52:4:44, v/v/v) で分離した。溶出物は励起波長 566 nm、蛍光波長 584 nm で蛍光検出した。

2) CYP3A4

野生型及び 554C>G (Thr185Ser, *16) 置換型 CYP3A4 発現プラスミドを調製し、配列確認を行った。ヒト肝癌由来培養細胞 HepG2 へのトランスフェクションは 10cm dish にて 60-80%コンフルエントとなった HepG2 細胞につき、6 µg のプラスミドを用いて行った。37°C にて 4 時間インキュベーション後、同量の 20% FCS を含む DMEM 培地を加え、さらに 24 時間インキュベートした。ミクロソーム画分の調製は、CYP1A2 と同様に行った。

CYP3A4、NADPH P450 reductase 及び Calnexin の発現レベルは、定法通り、イムノブロットイングにて解析した。

活性測定は基質 (最終添加濃度) として、テストステロン (200 µM)、ニフェジピン (30 µM)、ミダゾラム (5, 50, 200 µM)、及びテルフェナジン (1 µM) を使用した。反応時間は 2.5 分間または 15 分間であり、反応後に代謝産物であるテストステロン 6β-水酸化体、ニフェジピン酸化体、ミダゾラム 1'-及び 4-水酸化体、及びテルフェナジン t-ブチル水酸化体を高速液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) または LC/MS/MS により定量した。

②タイピング系開発・評価

1) ABCBI タイピング系の開発

ABCBI 遺伝子型と種々の薬物の体内動態との相関解析を行う上で重要な多型 12 種をタイピング対象に決定した。具体的には、翻訳領域における多型 6 種 (325G>A [Glu109Lys]、1236C>T

[Gly412Gly]、2677G>T/A [Ala893Ser/Thr]、3435C>T [Ile1145Ile]、3587T>G [Ile1196Ser]、3751G>A [Val1251Ile])、転写制御領域における多型 2 種 (-129T>C、-1789G>A) 及びイントロン領域において高頻度に見出されハプロタイプ決定に必須の多型 (ハプロタイプタグ SNP, tSNP) 4 種 (IVS26+59T>G、IVS21+49T>C、IVS13+81C>T、IVS27-182G>T) を選択した。まず 12 種の多型を 6 種ずつ 2 グループ (グループ 1 及びグループ 2) に分類した。近傍の多型は 1 つの PCR 増幅断片に含まれるように工夫し、それぞれのグループにつき 3 PCR 増幅断片及び 5 PCR 増幅断片をゲノム DNA 25 ng を鋳型として、Multiplex PCR 法により特異的に増幅した。なお、ゲノム DNA は日本人由来細胞株 DNA 等を用いた。反応液につき酵素処理を行い、未反応のプライマー及び dNTP を分解した。この精製した multiplex PCR 増幅産物を鋳型とし、各グループにつき、それぞれ 6 種の濃度の異なるタイピングプライマーを用いて同時タイピングを行った。タイピングプライマーは、その 3' 末端が各 SNP の直前にアニーリングする 18 mer から 30 mer の相補的配列をもち、その 5' 側にはプライマー長を調整するため、d(GACT) からなる非相補的な配列を付加した。一塩基伸長反応終了後、未反応の蛍光ラベル ddNTP を分解した。蛍光ラベルされた各伸張反応産物は、キャピラリー電気泳動により分離し、泳動データを解析した。

2) CYP3A4 タイピング系の開発

a) Pyrosequencing 法による CYP3A4 タイピング系の開発

CYP3A4 で見いだしたアミノ酸置換を伴う 3 遺伝子多型「554C>G, Thr185Ser, *16」「878T>C, Leu293Pro, *18」「1088C>T, Thr363Met, *11」及び最も頻度の高い遺伝子多型「IVS10+12G>A, *1G」を対象とした。まず各多型部位を含む約 250-400 bp の断片をゲノム DNA (10 ng) より特異的に PCR 増幅した。なお、ゲノム DNA は日本人由来細胞株 DNA 等を用いた。また、それぞれのプライマーのいずれか一方は、ビオチンラベルしたものをを用いた。PCR 産物を Streptavidin ビーズ に 10 分インキュベートして結合させ、フィルタープレートに移した。0.2 M NaOH を添加して 1 分間処理することにより 1 本鎖化し、さらに洗浄後、2 mM Mg-acetate を含む 20 mM Tris-acetate (pH 7.6) 中にビーズを懸濁し、96 穴専用 plate に移した。シーケンシングプライマーを 10 pmol 分加え、95°C で 2 分間処理した後、室温まで冷却し、シーケンシングプライマーと PCR 産物をハイブリダイズさせた。こ

れにつきミニシーケンシング反応を行い、塩基配列を解読することにより多型の存在を解析した。

b) アレル特異プライマー(ASP)-PCR 法による *CYP3A4* タイピング系の評価と Pyrosequencing 法との比較

対象とした SNP は、*CYP3A4*16* (554C>G) , **18* (878T>C) , **1G* (1VS10+12G>A) , **1I* (1088C>T) の 4 種類である。タイピング方法は、SNP 部位の各タイプ特異的配列を 3' 末端から 2 番目の塩基に持つアレル特異プライマーを用い、各アレル別々のチューブで PCR による増幅を行い、増幅産物を電気泳動もしくはサイバークリーン I 染色による蛍光強度の測定により、各プライマーに特異的な増幅産物の有無を測定する事でタイピングを行った。なお、ゲノム DNA は健康人ボランティア由来のものを用いた。

また本 ASP-PCR 法と Pyrosequencing 法によるタイピング結果の比較検討を日本人由来細胞株 DNA 等を用いて行った。

3) *DPYD* タイピング系の評価

DPYD 遺伝子に認められたアミノ酸置換を伴う一塩基多型(SNP)のうち、比較的出現頻度が高い 6 SNPs を検出する Simultaneous Multiple Mutation Detection (SMMD) 法チップ (株 TUM GENE) の評価を行った。即ち、10 ng/ μ l のゲノムより SNP 部位を含む約 100 bp の DNA 断片を PCR 増幅した。さらに、判定したい SNP 部位の近傍とハイブリダイズする別のプライマーを用いて SNP 判定用の「サンプルターゲット」を作製した(本プライマーは、SNP 部位より 10-20 塩基下流の配列を有すると共に、SNP の 1 塩基下流配列とハイブリダイズする配列を人工的に挿入してあるので、前述した DNA 断片を PCR 反応させることにより、SNP の 1 塩基下流に自己ループを形成した「サンプルターゲット」が作製できる)。その後、サンプルターゲットを金電極上のプローブ DNA とハイブリダイズさせ、DNA 連結反応を行なった(SNP 塩基がプローブの末端塩基と相補であれば DNA は連結し、非相補であれば連結しない)。その後、一旦 DNA をアルカリ変性させ、再び中性に戻し、インターカレーター(酸化還元物質)を作用させると、SNP と相補な塩基由来の DNA では非相補の場合よりインターカレーターとの結合が強く、酸化還元物質の存在量が多いため、大きな酸化電流が流れる。この電流値の大きさから SNP 型を判定した。なお、今年度はヒト由来検体を用いた解析は行っていない。

4) *UGT1A1* タイピング系の検討

*UGT1A1*1B* 及び **60* のタイピングに用いるインベーターアッセイ用プローブ類は Third Wave Technologies (Madison, WI, USA) より入手した。インベーター反応はサーマルサイクラーを用い、タイピングは蛍光光度計を用いて行った。

今回構築した 2 種の多型タイピング系において、*UGT1A1*1B* 検出用のサンプルとしては健康人由来ゲノム DNA が直接用いられ、*UGT1A1*60* 検出用のサンプルにはその PCR 産物が用いられた。前者の系でインベーター反応に用いたゲノム DNA は反応当たり 100 ng であった。また後者の系での PCR サンプルは、目的とする遺伝子断片を PCR 増幅し、その産物を 25、50、100、250、500 倍希釈したのものを用いた。なお、用いたゲノム DNA は他の方法で目的部位の塩基配列が既に決定されているものである。インベーター反応には 96 穴プレートを用い、反応液はサンプル 7.5 μ l とプローブ・酵素混液 7.5 μ l を混ぜ合わせ、その上に蒸発防止用のミネラルオイルを重層した。反応温度条件は *UGT1A1*1B* と **60* の両方とも 63 $^{\circ}$ C、反応時間は **1B* が 4 時間、**60* は最適時間条件を決めるため 10、20、40 分で検討した。反応終了後、各アレルにつき蛍光光度計で測定し、タイピングを行った。

③ バイオマーカー探索

Sprague-Dawley ラットに、PXR リガンドで *CYP3A1* などの誘導剤である PCN (pregnenolone-16 α -carbonitrile) を 3 日間 75 mg/kg 腹腔内投与した処置群 (n=3) と溶剤であるコーンオイルのみを投与したコントロール群 (n=3) の尿を、投与前から 4 日目まで経時的に集め、遠心後、測定まで -30 $^{\circ}$ C で保存した。4 日目に、ラットの肝臓を約 1 g 及び 5 g 採取し、定法に従いそれぞれ mRNA 及び肝ミクロゾームを調製し、測定まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。*CYP3A1* 及び *CYP3A2* の mRNA 発現量は、リアルタイム RT-PCR 法で測定した。Cyclophilin の mRNA 発現量をコントロールとして測定した。

④ 倫理面への配慮

「①遺伝子多型のインビトロ機能解析」の 2 研究は、既知の遺伝子多型に関するインビトロ機能解析のため、倫理面での問題は生じないと考えられる。

「②タイピング系開発・評価」の 4 研究の一部

は、ヒトゲノム DNA を用いた研究である。従って、インフォームドコンセントの取得、匿名化等、全て「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき行い、また倫理審査委員会の承認の下に行った。

「③バイオマーカー探索」はラットを用いた研究であるため、動物愛護の精神に基づき、苦痛やストレスを与えないよう十分配慮して行った。

C. 研究結果

①遺伝子多型のインビトロ機能解析

1) CYP1A2

空ベクター、野生型及び 3 種類の塩基置換型につき解析を行った。まず、*CYP1A2* mRNA 発現レベルを検討したところ、野生型及び 3 置換型間で有意な差は認められなかった。一方、イムノブロットングの結果、蛋白発現レベルでは、全ての置換型で低下が認められ、置換型-3 で約 35%の、置換型-1 と-2 で約 70%の有意な低下が認められた。小胞体マーカー蛋白である Calnexin レベルは、サンプル間で差は見られなかった (図 1)。

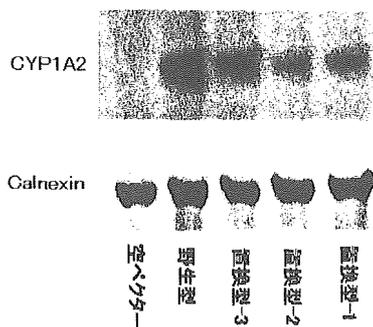


図1. V79細胞にトランスフェクトしたCYP1A2の発現レベル (Calnexinは小胞体のマーカー蛋白)

最後に 7-ethoxyresorufin の O-脱メチル化活性を測定したところ、いずれの置換型についても大幅な活性低下が認められた (表 1)。なお、空ベクターをトランスフェクトした場合の活性は、定量限界以下であった。

表1 7-ethoxyresorufinのO-脱メチル化活性

	<i>K_m</i> (μM)	<i>V_{max}</i> (pmol/min/mg protein)	<i>V_{max}/K_m</i> (μl/min/mg protein)
野生型	0.339 ± 0.035	1.754 ± 0.159	5.213 ± 0.654
置換型-1	1.121 ± 0.231	0.037 ± 0.008	0.030 ± 0.004
置換型-2	3.025 ± 1.064	0.024 ± 0.010	0.008 ± 0.001
置換型-3	0.978 ± 0.430	0.040 ± 0.009	0.044 ± 0.012

Each value represents the mean ± SD of three separate experiments.

2) CYP3A4

空ベクター、野生型及び*16 発現プラスミドを

トランスフェクトした HepG2 細胞より、それぞれ 6.75 mg, 13.1 mg, 14.5 mg のミクロソーム画分を調製した。イムノブロットングの結果、CYP3A4*16 蛋白質の発現量は野生型に比べて約 63%に減少していた (図 2)。なお、CYP3A4 含量は、野生型で 0.741、*16 で 0.466 pmol/mg 蛋白であった。また、空ベクター、野生型及び*16 で NADPH P450 reductase 含量に顕著な差は見られなかった (図 2)。

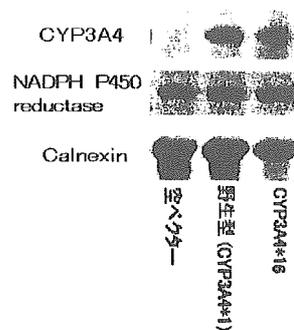


図2. HepG2細胞におけるNADPH P450還元酵素及びトランスフェクトしたCYP3A4の発現レベル (Calnexinは小胞体のマーカー蛋白)

活性測定の結果、ミダゾラムを基質とした場合、*16 は野生型に比して、反応時間 2.5 分間では、1'-及び 4-水酸化体の生成共に、ミクロソーム蛋白当たり約 5-28%に、pmol P450 当たりでも、8-26%に低下していた。一方、反応時間 15 分間では活性の低下率は pmol P450 当たりで 40%程度であった。他の基質では、テストステロン、ニフェジピンで活性の低下が、一方テルフェナジンでは逆に活性の上昇が pmol P450 当たりで見られ、*CYP3A4*16* (T185S) の変異が酵素蛋白の発現レベルと共に、酵素活性に対しても基質依存的に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

②タイピング系開発・評価

1) *ABCB1* タイピング系の開発

開発した SNaPshot 法により、ゲノム DNA を用いて遺伝子多型解析を行ったところ、本方法による解析結果は直接シーケンス法による結果と完全に一致した。一塩基プライマー伸長反応産物のキャピラリー電気泳動像の代表例を図 3 に示した。一塩基プライマー伸長反応産物の分離において、SNP 部位における 2 種のアレルが、いずれかのホモ接合体の場合は各 SNP 塩基に対応したそれぞれ一本のピークが検出され、ヘテロ接合体の場合は、その 2 種類の塩基を示す 2 本のピークが検出された。非特異的ピークの出現やピークの消失等は全

く認められなかった。

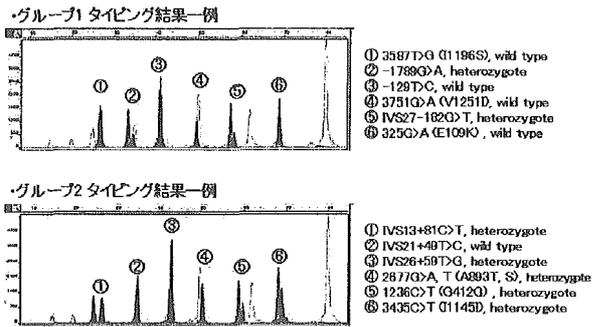


図3 SNaPshot法による $ABCB1$ 多型タイピング例。オレンジ色のピークはサイズマーカーを示す。

2) $CYP3A4$ タイピング系の開発

a) Pyrosequencing 法による $CYP3A4$ タイピング系の開発

対象とした 4 遺伝子多型につき、Pyrosequencing 法によるタイピング法を開発した。 $*16$ 及び $*18$ を例として図 4 に解析例を示した。本 Pyrosequencing 法により、ゲノム DNA を用いて遺伝子多型解析を行ったところ、解析結果は直接シーケンス法による結果と完全に一致した。

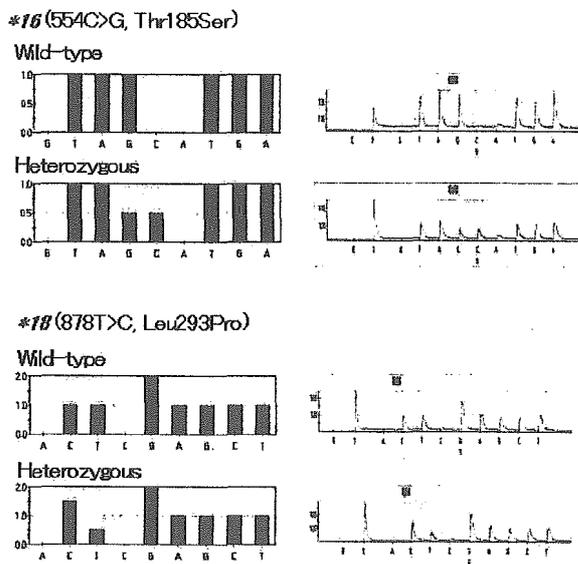


図4 Pyrosequencingによる $*16$ 及び $*18$ の解析例
左半分は理論的ピーク高さを、右半分は実際の結果を示す。

b) アレル特異プライマー (ASP)-PCR 法による $CYP3A4$ タイピング系の評価と Pyrosequencing 法との比較

ネガティブコントロール及びポジティブコントロールを用いた結果、試薬が正常に反応している

ことが確認された。また、DNA サンプルでの結果も同様に、アレル特有の増幅バンドを確認することにより、明らかにタイピングできている事が示された。

次に 4 種類の SNP すべてについて、48 検体を用いて ASP-PCR 法と Pyrosequencing 法を比較したところ、両者の結果は完全に一致した。なお、本結果は直接シーケンス法による結果とも一致した。

3) $DPYD$ タイピング系の評価

6 SNPs を人工的に導入したオリゴヌクレオチドを用いることにより、SNPs が正しく検出できることを確認した。今後、日本人由来細胞株 DNA 等を用いて、本タイピング系の評価を行う予定である。

4) $UGT1A1$ タイピング系の検討

$UGT1A1*1B$ の場合は、既に決定されている塩基配列データと同じ結果が今回の方法で得られ、コントロールも同様の結果が得られた。

$UGT1A1*60$ の場合は、100 倍希釈以上のサンプルを用いることで、既に決定されている塩基配列と同じ結果が得られた。なかでも、500 倍希釈サンプルを用いて、反応温度 10 分で得られた結果が最適であった。しかしコントロールは、蛍光シグナルの強度が弱く、期待された結果が得られなかった。

③ バイオマーカー探索

PCN 処理を行ったラットとコントロール・ラットの肝臓中の $CYP3A1$ 及び $CYP3A2$ の mRNA を RT-PCR 法で測定した結果を表 2 に示す。コントロールである cyclophilin の mRNA 発現量は処理群とコントロール群で全く差はなく、群内のばらつきも小さかった。PCN 処理により、mRNA のコピー数は、 $CYP3A1$ では平均約 38 倍、 $CYP3A2$ では平均約 5 倍増加し、PXR リガンド(PCN)によって $CYP3A$ が誘導されていることが確認できた。

表2 mRNA expression measured by RT-PCR in PCN treated and untreated Rat

	Threshold cycles (C_T)		
	$CYP3A1$	$CYP3A2$	Cyclophilin
PCN treated	13.07	14.64	18.35
	13.29	14.63	18.41
	13.23	14.69	18.25
Mean	13.20	14.65	18.34
S.D.	0.11	0.03	0.08
Untreated	18.32	16.93	18.24
	18.86	17.03	18.38
	18.23	16.91	18.38
Mean	18.47	16.96	18.33
S.D.	0.34	0.06	0.08
p value	<0.0001	<0.0001	0.96

D. 考察

①遺伝子多型のインビトロ機能解析

1) CYP1A2

CYP1A2 は気管支拡張剤テオフィリンや抗不整脈薬メキシレチン等の代謝に関与するチトクロム P450 分子種である。今回解析した 3 種の置換型はいずれも蛋白発現レベルの低下及び活性低下をもたらすことが明らかとなった。いずれも蛋白発現レベルの低下率以上に活性低下率が大きく、これら 3 種の遺伝子多型は蛋白発現レベル及び酵素活性レベルの両方に影響を及ぼすことが示唆された。今後は、今回検討した 7-ethoxyresorufin 以外の基質を用いて、その基質特異性を明らかとする必要があると思われる。

2) CYP3A4

CYP3A4 は現在使われている約半数の薬物の代謝に関与する最も重要なチトクロム P450 分子種である。日本人では数種のアミノ酸置換を伴う遺伝子多型が報告されているが、*CYP3A4*16* (Thr185Ser) は日本人でアリル頻度 0.014 で見いだされ、テストステロン水酸化活性につき約 50% の低下を引き起こすことが報告されている。

一方、遺伝子多型の機能影響に基質特異性が存在することが、*CYP2C9*3* 等において報告されている。本 *CYP3A4*16* は日本人において機能低下を伴う最も頻度の高い *CYP3A4* の遺伝子多型であることから、その基質特異性を明らかとすることは、重要と思われる。本研究班では、主任研究者がマイクロソーム画分の調製を、分担研究者が活性測定を行った。その結果、テストステロン、ニフェジピン及びミダゾラムでは*16 の代謝活性が野生型に比して減弱したが、テルフェナジンでは逆に上昇していた。従って、185 番目のスレオニンは *CYP3A4* において基質の結合或いは触媒活性に大きな影響を与えていると推察されるが、どのようなメカニズムによるのはこれからの検討課題である。

②タイピング系開発・評価

本年度は SNaPshot 法、Pyrosequencing 法、SMMD 法、インベーター法、ASP-PCR 法の 5 法につきタイピング系を開発・評価した。いずれの方法も、有用な方法と考えられたが、各方法の特徴としては、以下の点が挙げられる。

1) 今回行った解析条件下では、SNaPshot 法、SMMD 法、Pyrosequencing 法、ASP-PCR 法は使用ゲノム量が少ない。

2) SNaPshot 法及び SMMD 法は、複数の多型を同時に (1 本のチューブ・チップで) 解析できる。

3) Pyrosequencing 法はミニシーケンス法なので多型前後の配列に比較的左右されない。

4) ASP-PCR 法及びインベーター法は、比較的安価で繁用される機器のみで解析が可能。また ASP-PCR 法は標識等が必要なく、インベーター法は各多型に共通の標識プローブを用いることができる。

各手法は一長一短があり、またいずれの方法も比較的多検体での解析が容易なことから、目的多型の種類・数・特徴、等に応じて使い分ける必要があると考えられた。

③バイオマーカー探索

本年度の研究でバイオマーカー探索の比較対象となるデータが得られた。今後、尿中の代謝物の網羅的な解析及びイムノブロットングによる蛋白発現量の測定を行い、肝臓中の CYP3A 類の発現レベルと相関する尿中のバイオマーカーを検索する予定である。

E. 結論

2 種の遺伝子 (*CYP1A2*, *CYP3A4*) の多型につきインビトロ機能解析を遂行・開始し、*CYP1A2* で 3 種の遺伝子多型が機能低下をもたらすことを明らかとした。また 4 種の遺伝子 (*ABCB1*, *CYP3A4*, *DPYD*, *UGT1A1*) につき、タイピング系の開発・評価を行った。また尿中における CYP3A の活性指標と成り得るバイオマーカーを探索する目的で、肝臓における CYP3A の発現レベルを直接測定できるラットを対象に検討を進めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A. Soyama, Y. Saito, N. Hanioka, K. Maekawa, K. Komamura, S. Kamakura, M. Kitakaze, H. Tomoike, K. Ueno, Y. Goto, H. Kimura, M. Katoh, K. Sugai, O. Saitoh, M. Kawai, T. Ohnuma, T. Ohtsuki, C. Suzuki, N. Minami, N. Kamatani, S. Ozawa and J. Sawada: Single nucleotide polymorphisms and haplotypes of CYP1A2 in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **20**, 24-33 (2005).

2. 学会発表

- 1) Y. Saito, H. Fukushima-Uesaka, K. Komamura, H. Saito, Y. Goto, H. Minami, N. Saijo, N. Kamatani, S. Ozawa, J. Sawada: SNPs in *CYP3A4* and *CYP3A5* are in strong linkage disequilibrium in Japanese population. 第8回国際臨床薬理会議(平成16年8月4日、オーストラリア・ブリスベーン)。
- 2) M. Itoda, Y. Saito, K. Sai, S. Ozawa, K. Shirao, T. Hamaguchi, N. Yamamoto, H. Kunitoh, T. Tamura, Y. Ohe, H. Minami, A. Ohtsu, H. Ohmatsu, N. Saijo and J. Sawada: Analysis of single nucleotide polymorphisms in the *ABCB1*, *ABCC2* and *ABCG2* gene in irinotecan-administered Japanese subjects. 第19回日本薬物動態学会年会(平成16年11月17日、金沢)。
- 3) S. Ozawa, M. Saeki, Y. Saito, Y. Nakajima, Y. Matsumura, T. Hamaguchi, K. Shirao, H. Minami, A. Ohtsu, M. Muto, M. Kawamoto, N. Kamatani, T. Yoshida, N. Saijo and J. Sawada: Genetic polymorphisms of the *DPYD* gene encoding dihydropyrimidine dehydrogenase in a Japanese Population. 第19回日本薬物動態学会年会(平成16年11月19日、金沢)。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし(準備中)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

なお、以下の研究協力者に感謝する。

国立医薬品食品衛生研究所

機能生化学部部長	澤田 純一
医薬安全科学部室長	鹿庭 なほ子
薬理部室長	小澤 正吾
環境衛生化学部室長	神野 透人
機能生化学部主任研究官	前川 京子
岡山大学薬学部助教授	埴岡 伸光