

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス
総合研究事業

薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 千葉 寛

平成17年(2005年)3月

別添1

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス
総合研究事業

薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 千葉 寛

平成17年（2005年）3月

目 次

I. 総括研究報告

薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究 千葉 寛	-----	1
-------------------------------	-------	---

II. 分担研究報告

1. CYP2C9 の遺伝子多型と人種差 越前宏俊	-----	9
2. グルクロン酸転移酵素の遺伝子多型と人種差 鹿庭なほ子	-----	12
3. トランスポーターの遺伝子多型と人種差 家入一郎	-----	22
4. CYP3A の遺伝子多型と人種差 千葉 寛	-----	23

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	27
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	31
-----------------	-------	----

別添3

I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
総括研究報告書

薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究

主任研究者：千葉 寛
千葉大学大学院・薬学研究院・教授

研究要旨

本研究班の目的は、医薬品の体内動態を規定する主要な要因である薬物代謝酵素とトランスポーターに着目し、その変異遺伝子の発現頻度を日本人と他人種（白人種及び黒人種）とで比較することによりその相違を明らかにし、医薬品の薬効と安全性に人種差が生じる原因の一端を明らかにする事である。本年度は、白人、黒人及び日本人各 150 人のゲノム DNA を用いた CYP2C9、UGT1A1 についての解析を継続するとともに、トランスポーターに関しては OCT1, 2, 3 遺伝子の変異とメトフォルミンの非反応性性との関係を、CYP3A に関してはヒト肝ミクロソームにおける CYP3A 活性に与える、CYP3A4*2, CYP3A4*5, CYP3A4*6, CYP3A5*3 の影響を日本人と白色人種間で比較した。その結果、CYP2C9 については、CYP2C9*3 と *11 が黒人種において重要であり、白人種については、CYP2C9*2 と *3 が、日本人については CYP2C9*3 が重要であることが明らかとなった。これら以外の変異については、存在するにしてもアレル頻度が低く、副作用症例の原因究明には有用であるが、薬物投与前のスクリーニングには不向きであると考えられた。UGT1A1 についてはブロックを 2 つに分け、ハプロタイプ解析を行った。ブロック 1 では、8 種類のハプロタイプを、また、ブロック 2 では 6 種類のハプロタイプを 0.99 以上の確からしきで推定できた。特にグルクロン酸抱合能の低下と密接な関連にあると言われている、UGT1A1 のブロック 1 におけるハプロタイプ*28, *6, *37 の頻度は、人種間で大きく異なることが明らかとなった。トランスポーターについては、OCT1, 2, 3 遺伝子に、それぞれ 3, 2, 1 箇所のアミノ酸置換を伴う変異を同定し、人種間の頻度比較では、OCT1 遺伝子の P341L, V408M 変異に差が見られ、前者は日本人で頻度が高く、後者は白人で高い結果が得られた。一方、メトフォルミンのレスポナーとノンレスポナーとの相違を判別関数分析で評価した結果、V408M 変異による効果減弱が示唆され、判別効率は、55.5%であった。CYP3A に関しては、CYP3A4*6 のヘテロ型が日本人検体に一例検出され、その testosterone6 β -hydroxylation 活性は日本人野生型の約 1/3 の低値を示した。一方、日本人、白人種すべての肝ミクロソーム検体の中で、CYP3A5*1/*1 の遺伝子型を持つ検体は最も高い MDZ 水酸化活性を示し、1'-hydroxylation 活性については CYP3A5*3 との間に比較的明瞭な gene-dose effect を示すことが明らかになった。

分担研究者

越前宏俊
明治薬科大学教授

鹿庭なほ子
国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部室長

家入一郎
鳥取大学医学部附属病院薬剤部助教授

A. 研究目的

医薬品の効果や安全性には人種差が存在することがある。その原因は遺伝や生理的状态などの内的要因と医療環境などの外的要因に大別される。これらの要因の中で、遺伝要因は人種差の形成に最も重要な役割を果たしている。本研究の目的は医薬品の体内動態を規定する主要な要因である薬物代謝酵素とトランスポーターに着目し、その変異遺伝子の発現頻度を日本人と他人種（白人種及び黒色人種）とで比較することによりその相違を明らかにし、医薬品の薬効と安全性に人種差が生じる原因の一端を明らかにする事である。

B. 研究方法

*CYP2C9*2* については、PCR-制限酵素断片長多型(RFLP)法により判定し、*CYP2C9*3*、**4*、**5*、**11* は、エクソン7のほぼ全長をPCR法で増幅し、シーケンスにより解析をおこなった。*CYP2C9*6* 変異については、KiddsらのPCR-RFLP法により解析した。5'上流解析は約-2.1kbまで、全長を10数種の細区画に分割し、特異的なプライマーを設計して増幅し解析した。

UGT1A1 については、転写調節領域にあるフェノバルビタール反応性エンハンサー・モ

ジュール (PBREM) に存在する-3279T>G、及び、3'-非翻訳領域 (UTR) に存在する3箇所の一塩基多型 (SNP) について、パイロシーケンス法又はダイデオキシ・シーケンス法を用いて遺伝子型を決定した。ハプロタイプ解析については、昨年度までに解析したブロック1における4つのアレル、ブロック2における3つのアレルを指標に、人種ごとに *UGT1A1* のハプロタイプ構造を決定し、各ハプロタイプの頻度を比較した。

トランスポーターに関しては、鳥取大学病院内科に通院するMT服用患者33名を対象とした。HbA1cの変動と医師の診察をもとに、レスポンドー(24名)とノンレスポンドー(9名)に層別した。被験者に対しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に準拠した説明を行い、各自より書面による承諾を得た後に試料とした。また本研究は、鳥取大学医学部倫理審査委員会により審査・承認を得た後に実施した。

CYP3A4 および *CYP3A5* の変異解析は、PCR-RFLP法およびdenaturing HPLC法により行った。Testosterone (TS) 6β-hydroxylation 活性、midazolam (MDZ) 1'および4-hydroxylation 活性はHPLCにより測定した。なお、4施設の共通の試料として、白人、黒人及び日本人各150人のゲノムDNAを用いた。白人種及び黒人種の末梢血は、テネシーブラッドサービスより購入した。日本人の血液100人分は、鳥取大学医学部附属病院から提供された(A群等試料)。日本人の血液のうち50人分は、本研究のために新たに募集された志願者から提供を受け、DNAは定法に従い鳥取大学病院薬剤部で抽出した。なお、本研究のために新たに募集された志願者から提供を受けた血液については、鳥取大学医学部附属病院から提供された血液とともに、連結不可能匿名化されたので、個人情報の漏洩の危険性や人権に対する不利益の発生

は排除されている。また、志願者を募ったそれぞれの施設において、適正な研究倫理審査が行われ、志願者には十分な説明を行った後に、インフォームドコンセントを取得した。また、鳥取大学医学部附属病院から提供されたA群等試料は、本研究において使用しても差し支えないことが同施設において承認された。市販の白人種、黒人種の血液については、研究目的に使用されることに同意して採血されたものであり、連結不可能匿名化されている。

C. 研究結果

1) CYP2C9

黒人種における CYP2C9 の変異は、CYP2C9*3, *5, *6, *11 がそれぞれアレル頻度で1, 0.3, 0.3, 2.2%検出された。この頻度は、日本人150人における CYP2C9*3 の1.3%、および白人150人における CYP2C9*2, *3, *11 の11.0, 4.7, 0.013%と大きな差異を示した。また、上流解析の結果から、多数の1塩基置換の存在とそれらの組合せによる10種前後のパターンが明らかになった。しかし、3人種の5'上流域の配列は、野性型、CYP2C9*2 および*3 の翻訳領域変異に対して明確な対応があるが、人種特異的なものはなく、変異型に対応する上流域配列は人種間で似通っていた。

2) UGT1A1

ブロック1では、黒人種においては、ハプロタイプ*28 (-3279G;TA7;211G;686C)の頻度が最も高く(0.45)、日本人においては、*1a (-3279T;TA6;211G;686C)が主流であった(0.61)。白人種においては、両ハプロタイプの頻度は同程度に高かった。ハプロタイプ*6a (-3279T;TA6;211A;686C)は日本人に特徴的で、その頻度は約0.14であった。一方、黒人種では*36b 及び*37b (-3279T;TA5 及び TA8;211G;686C)の頻度が他の人種に比較し

て高かった。ブロック2における3つのアレルは、日本人においては完璧に連鎖していることが報告されているが、白人種及び黒人種における連鎖は日本人ほど強いものではなかった。

3) トランスポーター

OCT1, 2, 3 遺伝子にそれぞれ3, 2, 1箇所のアミノ酸置換を伴う変異を同定した。変異の種類と日本人での頻度は下記であった：OCT1 (F160L, 0.109), (P341L, 0.161), (V408M, 0.172); OCT2 (T201M, 0.01), (A270S); OCT3 (T424S, 0.05)。これらの変異の発現頻度に顕著な人種差は見られなかったが、OCT1 遺伝子については、P341L が日本人で、V408M は白人での発現率が高かった。一方、メトフォルミンのレスポonderとノンレスポonder間での変異の頻度比較では、V408M 変異の頻度がノンレスポonder群で高かった。さらに両群を区別する要因を明らかとする目的で、年齢、性別などの患者情報12項目、遺伝子変異情報5項目を取り入れた判別関数分析を実施した。その結果、年齢(係数=0.09)、BMI (body mass index, 0.23)、高脂血症治療薬の投与の有無(2.25)、T117075G(患者解析で認められた変異、-2.35)、V408M(-2.51)の関与が認められ、T117075G、V408M 両変異の存在でメトフォルミンの臨床効果が減弱する方向に変動することが明らかとなった。さらに、ヒト肝に発現するOCT1 mRNA発現量とV408M 変異との関連について検討したところ、V408M の変異の存在により、肝でのOCT1 の発現量が低下することが明らかとなった。

4) CYP3A

CYP3A4*2 および CYP3A4*5 は、解析した日本人 および白人種検体の全てにおいて検出されなかったが、CYP3A4*6 に関しては、日本人検体でヘテロ型が一例検出された。その検体のTS6 β ・hydroxylation 活性は0.086 nmol/mg protein/min と日本人の野生型の平均値(0.23 \pm 0.13 nmol/mg protein/min)の

約 1/3 の低値を示した。しかし、この検体を除いた日本人 15 検体の TS6 β -hydroxylation 活性の平均値 (0.23 \pm 0.12 nmol/mg protein/min) は白人種 21 検体の平均値(0.23 \pm 0.19 nmol/mg protein/min)との間で差が認められなかった。

一方、日本人および白人種の肝組織由来ゲノム DNA について *CYP3A5**3 の頻度を調べた結果、日本人が 0.81, 白人種が 0.85 であり、両人種間で差は認められなかった。しかし、野生型 *CYP3A5**1 アレルをホモ (*CYP3A5**1/*1)でもつ検体は、TS6 β -hydroxylation 活性及び高濃度(200 μ M)の 4-hydroxylation 活性を除いた MDZ の 1', 4-水酸化活性に関して、最も高い活性を示した。さらに MDZ 1'-hydroxylation 活性については、*CYP3A5**1/*3 の活性は *3/*3 の活性よりも高値を示し、比較的明瞭な gene-dose effect が認められたが、TS6 β -hydroxylation 活性と高濃度(200 μ M)の MDZ 4-hydroxylation 活性については、*CYP3A5**1/*3 と *3/*3 の間に明らかな差は認められなかった。

D. 考察

1) CYP2C9

今回の結果から投与量を個別化する目的に薬物投与前に遺伝子スクリーニングを行うためには黒人種の場合、*CYP2C9**3 と *11 が重要であり、白人種においては、*CYP2C9**2 と *3 が、日本人においては *CYP2C9**3 が重要であることが判明した。他の変異は、存在するにしてもアレル頻度が低く、副作用症例の原因究明には有用であるが、薬物投与前のスクリーニングには不向きであると考えられた。一方、翻訳領域の遺伝多型では *CYP2C9* の酵素活性の個人差を説明できる程頻度の高い変異アレルは存在しないことから、酵素発現量を調節すると想定される、5'上流域の変異とワーファリン代謝活性の個人差の関係を

を検討したが、個人差に関係する特定のハプロタイプパターンは見いだせなかった。今後の方向性としては、イントロン非翻訳部の多型、あるいはさらなる上流域解析が必要であると考えられた。

2) UGT1A1

今回の検討により 3'-UTR の 3 つの SNP に人種間で差が認められた。同遺伝子多型は、mRNA の安定性に関与している可能性があると考えられており、さらに、同部位が *UGT1A* の他の分子種と共有されるエクソンであるため、今回対象にした *UGT1A1* のみならず、すべての *UGT1A* 分子種の機能に影響を及ぼす可能性がある。Acuna らは、1941C>G の変異があると、主として *UGT1A9* で代謝される tolcapone による肝毒性が緩和される傾向にあると報告した。しかし、佐井らは、同変異があるとイリノテカンの活性代謝物である SN-38 の代謝が抑制されると報告しており、同アレルの *in vivo* における機能変化についてはさらに検討が必要である。遺伝子多型と薬物動態や薬効・副作用との関連を検討する際には、個々のアレルとの関係だけではなく、1本の DNA 上で連鎖したアレルの組み合わせ、すなわちハプロタイプとの関係を調べることが有用である。実際、比較的頻度の高い *UGT1A1**60 と TA ボックスにおける変異とはかなり強い連鎖があることが報告されており、本研究においても確認された。一方、*UGT1A1**6 (211G>A) はアジア人に特徴的な SNP であるために、ハプロタイプ解析においてマーカー SNP として使用されることが少ないが、本研究においては、211G>A と 686C>A も用いて、詳細なハプロタイプ構造を決定し、人種間の差を検討することができた。ハプロタイプの *28 あるいは *6 のいずれかを同時に持つ患者では、SN-38 の代謝が大きく低下する。現在、FDA ではイリノテカンの治療における遺伝

子多型診断の導入を検討中であるが、本研究成果は、日本人のみならず、米国に住むアジア系癌患者の安全性に対して有用な情報を提供できるのではないかと考えられた。また、本研究で示された *UGT1A1* の機能変化を伴うハプロタイプの頻度が人種間で相違することは、医薬品の開発にあたって、有効成分の主たる解毒化機構が、*UGT1A1* によるグルクロン酸抱合である場合には、人種間で異なるハプロタイプに対して注意を向けなければならないことを示唆するものと考えられた。

3) トランスポーター

OCT1, 2, 3 遺伝子においても、他の薬物トランスポーター同様に多くの変異を同定したが、他のトランスポーターと比較して少ない傾向が見られた。しかし、人種間の頻度比較では人種差の存在が認められた。一方、メトフォルミンのノンレスポonderとの関係では、*OCT1* の *V408M* 変異の関与が示された。*V408M* 変異の機能については、発現系による検討により、輸送能の低下が報告されている。本検討でも同様の結果が得られているが、その背景としては、肝での発現量の低下が示唆された。*in vivo* 機能評価は本検討が初めてであり、今後の追加検討が待たれる。

4) CYP3A

今回見いだされた *CYP3A4*6* の heterozygote (GHL29) の *in vitro* における testosterone 6β -hydroxylation 活性は平均の約 1/3 程度であった。*CYP3A4*6* は 1 塩基挿入によりフレームシフトが起こり、その結果、ストップコドンを形成する。そのため、*CYP3A4*6* を heterozygote として持つ個体では活性が通常約 1/2 程度に低下するものと予想され、今回得られた結果とほぼ一致するものであった。しかし、*CYP3A4*6* の頻度はきわめて低く、日本人における *CYP3A4* の活性低下に一部寄与する可能性はあるものの、日本人と白人種における *CYP3A* 活性に

人種差を生じる主要な原因となる可能性は低いものと思われた。

一方、*CYP3A* subfamily の一分子種である *CYP3A5* は個体によっては *CYP3A4* と同程度発現していることもあり、さらに *CYP3A4* と類似した基質特異性を示すこともあり、*CYP3A* 活性に一部寄与している可能性が指摘されている。これまでに、発現系およびヒト肝ミクロソームを用いた検討により、*CYP3A5* の TS 6β -hydroxylation 活性は *CYP3A4* より高いあるいは同程度であるという報告や低いという報告があり統一した見解は得られていないが、*MDZ* 1'-hydroxylation 活性については *CYP3A5* の活性が *CYP3A4* より高いという報告が多く、逆に *MDZ* 4-hydroxylation 活性は、*CYP3A4* よりも低いか、同程度であるという報告が多い。今回の結果はこれらの報告とよく一致し、*MDZ* 1'-hydroxylation では *CYP3A5* の関与が大きいため、比較的明瞭な gene-dose effect を示したのに対し、*MDZ* 4-hydroxylation 活性については低濃度のみ gene-dose effect が認められ、testosterone 6β -hydroxylation 活性については明瞭な gene-dose effect が認められなかったものと考えられた。実際、*MDZ* 4-hydroxylation 活性については高濃度時において *CYP3A4* 活性と高い相関を示すとされており、高濃度の *MDZ* 4-hydroxylation 活性では **1/*3* と **3/*3* に差が認められなかったという今回の結果とよく一致するものと考えられた。

E. 結論

1) 白人、黒人、アジア (日本) 人の 3 人種における *CYP2C9* 遺伝子の多型検索を完了した。近年、遺伝子発現の調節には非翻訳領域、さらなる 5' 上流域、あるいは 3' 下流領域の多型が関係することが明らかになりつつある。今後は、この方面への研究展開が望まれる。

薬物動態関連遺伝子の人種差の検討は、従来考えられているよりも遙かに複雑であることが明らかとなった。

2) *UGT1A1* を2つに分け、ハプロタイプ解析を行った。ブロック1では、8種類のハプロタイプを、また、ブロック2では6種類のハプロタイプを0.99以上の確からしきで推定できた。特にグルクロン酸抱合能の低下と密接な関連にあると言われている、*UGT1A1* のブロック1におけるハプロタイプ*28、*6、*37の頻度は、人種間で大きく異なった。本研究結果は、欧米と日本では、主として*UGT1A1*によって解毒される薬物を投与する場合、あるいは、開発する場合には、それぞれ異なるタイプの遺伝子多型に注意を払わなければならないことを示唆するものと考えられた。

3) メトフォルミンの血糖降下作用に見る個人差に*OCT1*遺伝子多型が関与する可能性が示唆された。しかし、年齢、体重、合併症といった患者情報の考慮が必要であり、さらに良好な予測精度を得るためには、関与する諸タンパク遺伝子の情報も必要と考えられた。

4) *CYP3A4**6は、日本人における*CYP3A4*の活性低下に一部寄与する可能性はあるものの、日本人、白人種における頻度がきわめて低いため、両人種における*CYP3A*活性の人種差を説明する主要な要因とはなり得ないものと考えられた。それに対し*CYP3A5**3は頻度が高く*CYP3A5*の関与が高い薬物の代謝の個人差の重要な要因となると考えられた。しかし、日本人と白人種における*CYP3A5**3の頻度にはほとんど差がないため、個人差の原因とはなっても、人種差の原因になる可能性は低いものと思われる。ただし、黒人種については白人種や日本人と比較して*CYP3A5**3の頻度が有意に低いことから、日本人あるいは白人種との間に人種差が生じる原因となる可能性は考慮する必要があると考

えられた。

F. 研究発表

論文発表

Takahashi H, Wilkinson GR, Padriani R, Echizen H: CYP2C9 and oral anticoagulation therapy with acenocoumarol and warfarin: similarities yet differences.

Clin Pharmacol Ther. 75: 376-80, 2004.

Takahashi H, Ieiri I, Wilkinson GR, Mayo G, Kashima T, Kimura S, Otsubo K, Echizen H: 5'-Flanking region polymorphisms of *CYP2C9* and their relationship to S-warfarin metabolism in Caucasian and Japanese patients, Blood 103:3055-3057, 2004.

N. Kaniwa, K. Kurose, H. Jinnno, T.

Tanaka-Kagawa, Y. Saito, M. Saeki, J. Sawada, M. Tohkin and R. Hasegawa: Racial variability in haplotype frequencies of *UGT1A1* and glucuronidation activity of a novel SNP 686C>T (P229L) found in an African-American. Drug Metab. Dispos., 33, 458-465, 2005.

Ieiri I, Takane H, Otsubo K. The MDR1 (*ABCB1*) gene polymorphism and its clinical implications. Clin Pharmacokinet, 43; 553-576, 2004

Kobayashi D, Ieiri I, Hirota T, et al. Functional assessment of *ABCG2* (*BCRP*) gene polymorphisms to protein expression in human placenta. Drug Metab Dispos 33; 94-101, 2005

Takane H, Ieiri I, Kobayashi D, et al. Haplotype-oriented genetic analysis and functional assessment of promoter variants in the MDR1 (*ABCB1*) gene. J Pharmacol Ther Exp

311; 1179-1187, 2004

Hirota T, Ieiri I, Takane H, et al. Allelic expression imbalance of the human CYP3A4 gene and individual phenotypic status. *Hum Mol Genet* 13; 2959-2969, 2004

Morita J, Kobayashi K, Wanibuchi A, Kimura M, Irie S, Ishizaki T, Chiba K. A novel single nucleotide polymorphism (SNP) of the CYP2C19 gene in a Japanese subject with lowered capacity of mephobarbital 4'-hydroxylation. *Drug Metab Pharmacokinet.* 19:236-8, 2004

Kobayashi K, Morita J, Chiba K, Wanibuchi A, Kimura M, Irie S, Urae A, Ishizaki T. Pharmacogenetic roles of CYP2C19 and CYP2B6 in the metabolism of R- and S-mephobarbital in humans. *Pharmacogenetics.* 14:549-56, 2004

Iida I, Miyata A, Arai M, Hirota M, Akimoto M, Higuchi S, Kobayashi K, Chiba K. Catalytic roles of CYP2C9 and its variants (CYP2C9*2 and CYP2C9*3) in lornoxicam 5'-hydroxylation. *Drug Metab Dispos.* 32:7-9, 2004

Morimoto K, Oishi T, Ueda S, Ueda M, Hosokawa M, Chiba K. A novel variant allele of OATP-C (SLCO1B1) found in a Japanese patient with pravastatin-induced myopathy. *Drug Metab Pharmacokinet.* 19:453-5, 2004

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

H. 健康危険情報
なし

別添4

II 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究者報告書

薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究 (14130301)

分担研究者 越前 宏俊 明治薬科大学 教授

研究要旨 我々は肝薬物代謝酵素である CYP 分子種中でも CYP3A に次いで発現量の多い CYP2C ファミリー、特にその遺伝子多型の動態への影響と臨床的な意義付けが明確である CYP2C9 の遺伝子多型について検討した。その結果、投与量を個別化する目的に薬物投与前に遺伝子スクリーニングを行う目的に限れば、黒人集団においては、CYP2C9*3 と*11 が重要であり、白人においては、CYP2C9*2 と *3 が重要、日本人においては CYP2C9*3 が重要であることが判明した。他の変異は、存在するにしてもアレル頻度が低い、副作用症例の原因究明には有用であるが、薬物投与前のスクリーニングには不向きであると考えられた。また、同酵素の翻訳領域の遺伝子多型の探索の結果、酵素活性の個人差を説明できる程頻度の高い変異アレルは存在しなかった。人種特異的な上流域パターンもこれまでの検討では認められていない。黒人においてのみ認められる翻訳領域の変異 CYP2C9*5, *6 においても上流域の配列パターンは従来の野性型パターンと合致していた。但し、翻訳領域が野性型である黒人に 2%ではあるが、従来 CYP2C9*3 とのみ連鎖している上流域の変異が発見された。この意義付けは将来の検討が必要である。近年、遺伝子発現の調節には非翻訳領域、さらなる 5'上流域、あるいは 3'下流域の多型が関係することが明らかになりつつある。今後は、この方面への研究展開が望まれる。

A. 研究目的

医薬品の効果と副作用に関係するデータのブリッジングには、人種的な薬物動態と感受性の差異の検討が不可欠である。諸外国における研究で得られた新規医薬品に関わる薬物動態および感受性のデータを我が国での臨床試験にブリッジングするためには、薬物動態に関連する機能分子である薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子多型に関する人種差情報が重要である。我々は肝薬物代謝酵素である CYP 分子種中でも CYP3A に次いで発現量の多い CYP2C ファミリーの遺伝子多型を受け持ち、白人、黒人、アジア（日本）人、各 150 検体について検討を実施した。

B. 研究方法

白人、黒人、サンプルに関しては、班研究で協同入手した試料を用い、日本人サンプルは国内の共同研究各施設においてプロトコールを施設内倫理委員会により了承を受けた

上で文書同意の得られた試料を用いた。

3 年間の研究期間を通じて 3 人種の試料の CYP2C9 翻訳領域および 5'上流域の多型検討を完成させた。具体的には、CYP2C9*2 については、我々が従来から用いている PCR-制限酵素断片長多型(RFLP)法により判定し、CYP2C9*3、*4、*5、*11 は、変異部位が同一のエクソン 7 に存在するため、このエクソンのほぼ全長を PCR 法で増幅し、シーケンスにより同時解析をおこなった。更に、近年黒人か報告のあった、CYP2C9*6 変異については、Kidds らの PCR-RFLP 法により解析したが、その際の陽性対照試料には Joyce Goldstein から好意にて提供された CYP2C9*6 試料を用いた。5'上流解析は約-2.1kb まで、全長を 10 数種の細区画に分割し、特異的なプライマーを設計して増幅し解析した。

C. 研究結果

黒人試料 150 名に対して検討を加えた結果、

CYP2C9の変異は、CYP2C9*3、*5、*6、*11がそれぞれアレル頻度で1、0.3、0.3、2.2%検出された。この頻度は、日本人150人におけるCYP2C9*3の1.3%、および白人150人におけるCYP2C9*2、*3、*11の11.0、4.7、0.013%と大きな差異を示した。また、上流解析の結果から、多数の1塩基置換の存在とそれらの組合せによる10種前後のパターンが明らかになった。しかし、3人種の5'上流域の配列は、野性型、CYP2C9*2 および*3の翻訳領域変異に対して明確な対応があるが、人種特異的なものではなく、変異型に対応する上流域配列は人種間で良く似通っていた。但し、黒人で翻訳領域がホモ野性型保有者のなかで2%の対象者において、従来他の人種においてCYP2C9*3の上流域に特有な4塩基置換のうち2塩基を有する者が発見された。また、黒人のなかで、CYP2C9*5、*6、*11を有する対象者の5'上流域を探索すると、上流域塩基配列は従来白人、日本人の翻訳領域野性型に対応する4種類の上流域配列の何れかに合致していた。

D. 考察

CYP2C9の遺伝子多型は、3年次の研究終了時点で、CYP2C9*2から*13までの12種変異が、CYP命名委員会のホームページ上に報告されている。特に、新規の変異登録は主としてGoldsteinの研究室の貢献による黒人対象者から検出されたものが多い。本研究では、黒人集団を対象として、酵素活性への影響があることが何らかの形で証明されているCYP2C9*2、*3、*4、*5、*6、*11について、黒人、白人、日本人の3人種について変異の解析を完了した。

その結果、投与量を個別化する目的に薬物投与前に遺伝子スクリーニングを行う目的に限れば、黒人集団においては、CYP2C9*3と*11が重要であり、白人においては、CYP2C9*2と*3が重要、日本人においてはCYP2C9*3が重要であることが判明した。他の変異は、存在するにしてもアレル頻度が低い、副作用症

例の原因究明には有用であるが、薬物投与前のスクリーニングには不向きであると考えられた。

CYP2C9により代謝される薬物、とくにワルファリン、の体内動態には大きな個人差が存在するため、同酵素の翻訳領域の遺伝多型の探索が広く行われた。しかし、本研究においても示されたように、酵素活性の個人差を説明できる程頻度の高い変異アレルは存在しなかった。このため、酵素発現量を調節すると想定される、5'上流域の変異および個人差が検討された。本年度の結果から、上流域には多数の変異に基づく10種前後のハプロタイプパターンが存在する。しかし、翻訳領域が野性型の患者において異なる上流域パターンを有する者の間にワルファリンの代謝活性において明確な差異は認められなかった。

また、人種特異的な上流域パターンもこれまでの検討では認められていない。黒人においてのみ認められる翻訳領域の変異CYP2C9*5、*6においても上流域の配列パターンは従来の野性型パターンと合致していた。

詳細なハプロタイプ解析は今後行われるが、今後の方向性としては、イントロン非翻訳部の多型、あるいはさらなる上流域解析が必要であると結論された。

E. 結論

白人、黒人、アジア（日本）人の3人種におけるCYP2C9遺伝子の多型検索が完成された。近年、遺伝子発現の調節には非翻訳領域、さらなる5'上流域、あるいは3'下流領域の多型が関係することが明らかになりつつある。今後は、この方面への研究展開が望まれる。薬物動態関連遺伝子の人種差の検討は、従来考えられているよりも遙かに複雑であることが明らかとなった。

F. 健康被害状況

3年間を通じて倫理上および健康上の被害はありませんでした。

G. 研究発表

1.論文発表

Takahashi H, Wilkinson GR, Padrini R, Echizen H:
CYP2C9 and oral anticoagulation therapy with
acenocoumarol and warfarin: similarities yet
differences.

Clin Pharmacol Ther. 75: 376-80, 2004.

Takahashi H, Ieiri I, Wilkinson GR, Mayo G,
Kashima T, Kimura S, Otsubo K, Echizen H:
5'-Flanking region polymorphisms of *CYP2C9* and
their relationship to S-warfarin metabolism in
Caucasian and Japanese patients, Blood
103:3055-3057, 2004.

2.学会発表

Echizen H, Pharmaceutical Sciences World
Congress 2004, Variability analysis of drug
response, Symposium 32: Therapeutic Drug
Monitoring: Variability in Drug Response, May 31,
2004, Kyoto, Japan

Echizen H, Population differences in
pharmacokinetics and pharmacodynamics: what
remains to be done, Association of the British
Pharmaceutical Industry (ABPI)/Japan
Pharmaceutical Manufacturers Association (JPMA)
R&D Conference 2004, June 3, 2004, Kyoto, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況
ありません。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
（分担）研究報告書

薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究

分担研究者 鹿庭 なほ子 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部室長

研究要旨 UGT の分子種のひとつである UGT1A1 をコードする遺伝子 *UGT1A1* には、機能の変化を伴う多くの多型が存在することが知られている。本研究では、白人種、黒人種、日本人間で、*UGT1A1* 遺伝子のハプロタイプ構造と頻度の差を検討する目的で、各人種 150 人分の末梢血より抽出した DNA を用いて、*UGT1A1* 遺伝子を解析した。

本年度は、転写調節領域にあるフェノバルビタール反応性エンハンサー・モジュール (PBREM) に存在する-3279T>G、及び、3'-非翻訳領域 (UTR) に存在する 3 箇所の一塩基多型 (SNP) について、パイロシークエンス法又はダイデオキシ・シークエンス法を用いて遺伝子型を決定した。*UGT1A1* は、エンハンサー・プロモーター及びエクソン 1 を含むブロック 1 とエクソン 2-5 を含むブロック 2 に分けることができるが、本研究で今年度及び昨年度までに解析したブロック 1 における 4 つのアレル、ブロック 2 における 3 つのアレルを指標に、人種ごとに *UGT1A1* のハプロタイプ構造を決定し、各ハプロタイプの頻度を比較した。ブロック 1 では、黒人種においては、ハプロタイプ*28(-3279G;TA7;211G;686C)の頻度が最も高く(0.45)、日本人においては、*1a(-3279T;TA6;211G;686C)が主流であった(0.61)。白人種においては、両ハプロタイプの頻度は同程度に高かった。ハプロタイプ *6a(-3279T;TA6;211A;686C)は日本人に特徴的で、その頻度は約 0.14 であった。一方、黒人種では*36b 及び*37b(-3279T;TA5 及び TA8;211G;686C)の頻度が他の人種に比較して高かった。ブロック 2 における 3 つのアレルは、日本人においては完璧に連鎖していると報告されているが、白人種及び黒人種における連鎖は日本人ほど強いものではなかった。

UGT1A1 のブロック 1 におけるハプロタイプ*28、*37 及び*6 のマーカーである TATA ボックス内 TA リピート数 (7 又は 8) 及び 211G>A は、グルクロン酸抱合能の低下と関連があると報告されている。本研究の結果は、*UGT1A1* によって代謝される薬物の投与に際しては、欧米と日本では、それぞれ異なるタイプの遺伝子型に注意を払わなければならないことを示唆している。

A. 研究目的

現在、医薬品開発のグローバル化が急速に進んでいるが、医薬品の体内動態には人種差が存在することが知られており、新医薬品の承認審査においては、国外で得られた臨床試験の結果から、日本人における医薬品の効果と安全性を外挿できるとは限らない。しかし、体内動態の人種差を説明するための基本的な情報は CYP2D6 や CYP2C19 など一部の薬物代謝酵素に限られており、その他の薬物代謝酵素やトランスポーターについては信頼できる基本情報が得られておらず、薬効発現の人種差に関わる情報基盤を形成することは厚生労働行政上の重要な課題と言える。本研究は医薬品の体内動態を規定する主要な要因である薬物代謝酵素とトランスポーターに着目し、その変異型遺伝子の発現頻度を日本人と他人種(白人種及び黒人種)とで比較することにより、医薬品の薬効と安全性に人種差が生じる原因の一端を究明する事を目的としている。

筆者は、本研究班においては、第II相の代謝の約40%を占めているUDPグルクロノシル転移酵素(UGT)¹⁾の分子種のひとつであるUGT1A1をコードする遺伝子UGT1A1の多型の人種間差の検討を担当している。UGT1A1のmRNAの大きさは約1.6 kbであり、蛋白質は約50 kDa、約530のアミノ酸からなる。UGT1A1のエクソン2~5は他のUGT1A分子種と共有されており、基質結合部位と考えられるエクソン1だけが、UGT1A1に特異的である。²⁾UGT1A1は抗癌剤イリノテカンの活性代謝物であるSN-38をグルクロン酸抱合するこ

とで知られており、UGT1A1の変異と、イリノテカン投与によって生じる重篤な下痢及び骨髄抑制との関連が疑われている。^{3,5)}

UGT1A1には、現在までに60以上の多型が報告されており、これらの多くは高ビリルビン血症を主症状とするGilbert症候群、又は、Crigler-Najjar(CN)症候群タイプI及びタイプIIと関係している。²⁾この中で、日本人で頻度の高い変異は、-3279T>G(UGT1A1*60)を含む転写調整領域における数カ所の変異、プロモータ領域におけるTA_{6>7}の変異(UGT1A1*28)、エクソン1における211G>A(G71R, UGT1A1*6)、及び、3'-非翻訳領域(UTR)の数カ所の変異である。また、頻度は高くないが、アミノ酸置換を伴う変異エクソン1における686C>A(P229Q, UGT1A1*27)も報告されている。⁶⁾これらは、*in vitro*機能解析によって、抗ガン剤イリノテカンの活性代謝物SN-38の代謝活性や転写活性が低下することが確認されている。^{7,8)}これらの変異の幾つかは互いに強くリンクし、同一の染色体上に存在している。佐井らは、日本人におけるUGT1A1のハプロタイプを、上記のマーカーを利用することにより決定できると報告した。⁶⁾

そこで、本研究においては、UGT1A1のフェノバルビタール反応性エンハンサー・モジュール(PBREM)に存在するポジション-3279、プロモータ領域(TATAボックス)内のTAのリピート数、エクソン1のポジション211と686、及び、3'-UTRに存在する3つのポジション(1813, 1941, 2042)における遺伝子型を測定し、これらのマーカー変異を用いて日本人、白人種及

び黒色人種におけるハプロタイプ解析を行い、人種間の *UGT1A1* ハプロタイプの構造と頻度を比較することとした。

今年度は、-3279T>G、及び、*UGT1A1* の 3'-UTR 領域に存在する 3つの SNPs (1813C>T, 1941C>G 及び 2042C>G) について、パイロシーケンス法又はダイデオキシ・シーケンス法にて遺伝子型を決定した。また、上記のマーカー変異を用いて人種ごとにハプロタイプ・ディプロタイプ解析を行い、人種間の *UGT1A1* ハプロタイプの構造と頻度とを比較した。

B. 研究方法

(1) 試料

DNA は末梢血より採取した。白人種及び黒人種の末梢血は、テネシーブラッドサービスより購入した。日本人の血液 100 人分は、鳥取大学医学部附属病院から提供された (A 群等試料)。日本人の血液のうち 50 人分は、本研究のために新たに募集された志願者から提供を受けた。

(2) DNA 抽出

定法に従い末梢血より DNA を抽出した。

(3) 遺伝子のタイピング

1) パイロシーケンス法による遺伝子のタイピング⁹⁾：*UGT1A1* の-3279T/G は、3つの人種の試料とも、佐伯らの方法⁹⁾に従ってパイロシーケンス法によりその遺伝子型を同定した。また、日本人の試料の 1941 C/G についても、パイロシーケンス法によりその遺伝子型を同定した。なお、1941 C/G 同定のための増幅用プライマーセットには、

(biotin-ATTTGAATATGTATCGTGCCC 及び CATTCAATTCATTTACCTACACT) を、シーケンス用プライマーには (CAGTAGGGGCAGC) を用いた。

2) ダイデオキシ・シーケンス法：白人種及び黒人種の 3'-UTR の 3箇所の SNPs については、パイロシーケンス法で用いた増幅用プライマーと同じものを用いて PCR を行い、遺伝子型を同定した。¹⁰⁾

(4) ハプロタイプ解析

各ポジションの遺伝子を決定することができた日本人の試料 150 人分、白人種の試料 147 人分、及び、黒人種の試料 148 人分について、PHASE version 2.0^{11, 12)} を用いて、人種ごとにディプロタイプを推定した。

(5) ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針との関係

本研究のために新たに募集された志願者から提供を受けた血液については、鳥取大学医学部附属病院から提供された血液とともに、連結不可能匿名化されたので、個人情報漏洩の危険性や人権に対する不利益の発生は排除されている。また、志願者を募ったそれぞれの施設において、適正な研究倫理審査が行われ、志願者には十分な説明を行った後に、インフォームドコンセントを取得した。また、鳥取大学医学部附属病院から提供された A 群等試料は、本研究において使用しても差し支えないことが同施設において承認された。市販の白人種、黒人種の血液については、研究目的に使用されることに同意して採血されたものであり、連結不可能匿名化されているため、倫理上の問題は発生しない試料である。

C. 研究結果

遺伝子のタイピングは、短時間に多数のサンプルを処理できるパイロシークセンス法で行ったが、互いに近接する 3'-UTR の 3 箇所の SNPs については、1 組のプライマーを用いて増幅、配列解析が可能であるダイデオキシ・シークセンス法で行った。日本人については、この 3 箇所の SNPs は完全にリンクしていることが、著者らのグループによって確認されていたために、⁶⁾ このうち 1 箇所 (1941C>G) についてのみ、パイロシークセンス法で遺伝子型を決定した。

(1) 各遺伝子多型の頻度

1) UGT1A1*60 (-3279T>G) の頻度

UGT1A1*60 は UGT1A1 のエンハンサー領域にある PBREM に生じる変異 (-3279T>G) である。本研究のサンプルから推定された UGT1A1 の PBREM における各アレルの頻度を Table 1 に示した。黒人種においては、約 90% がリファレンス・シークセンスとは異なるアレルであった。白人種においては、変異型とリファレンス・シークセンスと同一型とがほぼ同程度であった。日本人においては、リファレンス・シークセンスと同一型の方が主流であり、変異型の頻度は約 25% であった。3 つの人種間における変異型の出現頻度の差は、統計的に有意であった (χ^2 検定、 $p < 0.0001$)。

2) 3'-UTR における SNPs

既に述べたように、3'-UTR における 3 箇所の SNPs は、日本人においては完全にリンクしていたので、⁶⁾ 1941 以外のポジシ

ヨンの SNPs の頻度は、1941C>G の頻度と同じと見なした。日本人における 3'-UTR における SNPs の頻度は約 10% であった。白人種及び黒人種では、それぞれ、3 箇所の SNPs の頻度は異なり、いずれの人種においても、1941C>G の頻度が最低であった。同変異の頻度は黒人種>白人種>日本人の順で低くなり、Table 1 に示すように、発現頻度の人種間差は有意であった ($p = 0.0074$)。一方、白人種、黒人種ともに、1813C>T の頻度は 2042C>G の頻度よりも若干低かった。なお、両 SNPs の発現頻度の人種間差も統計的に有意であった ($p < 0.0001$)。

(2) ハプロタイプ解析

佐井らは、連鎖不平衡解析によって、UGT1A1 は、転写調節領域とエクソン 1 を含むブロック 1 と、エクソン 2~5 を含むブロック 2 の 2 つのブロックに分けられると報告した。⁶⁾ これに従い、本研究でも、UGT1A1 を 2 つのブロックに分けて、ブロック 1 では -3279T/G, 211G/A, 686C/A 及び TATA box の TA リピート数をマーカーとして、ブロック 2 では 3'-UTR の 3 つの SNPs をマーカーとして、すべてのポジションで遺伝子型を同定できた試料について、人種ごとにディプロタイプを推定した。日本人では 145 人で、白人種では 144 人で、また、黒人種では 147 人で 0.99 以上の確からしきで、ディプロタイプを推定することができた。ブロック 1 では 8 種 (Table 2)、ブロック 2 では 6 種 (Table 3) のハプロタイプを推定できた。

日本人では、佐井らのサンプルでは見出されなかった、UGT1A1*6 と UGT1A1*60 のアレルを同時に有するハプロタイプが 1

例見出された。また、アジア人以外では極めて稀である *UGT1A1*6* が、白人種で検出されたが、残念ながらこれを有する被験者のディプロタイプを高い確度で決定することはできなかった。本研究においても、日本人で *UGT1A1*27* を有する被験者が1名見出された。本アレルが *UGT1A1*28* と同一染色体上にあることが示唆されていたが^{6,13)}、本研究においては、同アレルを有する被験者が *UGT1A1*28* をホモで有していたので、*UGT1A1*27* と *UGT1A1*28* が同一染色体上にあることが確認できた。

ブロック1では、黒人種においては、ハプロタイプ*28 (-3279G;TA7;211G;686C) の頻度が最も高く(0.45)、日本人においては、*1a (-3279T;TA6;211G;686C) が主流であった(0.61)。白人種においては、両ハプロタイプの頻度は同程度に高かった。ハプロタイプ*6a (-3279T;TA6;211A;686C) は日本人に特徴的なハプロタイプでその頻度は、約0.14であった。一方、黒人種では*36b 及び*37b (-3279T;TA5 及び TA8;211G;686C) の頻度が他の人種に比較して高かった。各ハプロタイプの人種内での分布パターンには、人種間で統計的に有意の差があった。(Table 2)

ブロック2では、日本人については、1941C/G の遺伝子型に基づいて、佐井らの報告に従って、ハプロタイプ*IA (1941C) または*IB (1941G) であるかを決定した。白人種及び黒人種では、ハプロタイプ*IA、*IB の他に、Table 3 に示す如く、*IC~*IF のハプロタイプが存在した。特徴的なのは、1941C>G が存在する場合には、1813T 及び 2042G のアレルも同時に存在する場合が殆どで、例外は白人種で2例見られたハプロ

タイプ*IE のみであった。いずれの人種もハプロタイプ*IA が主流であったが、その頻度は日本人>白人種>黒人種であった。ブロック2においても、各ハプロタイプの人種内での分布パターンには、人種間で統計的に有意の差があった。(Table 3)

D. 考察

UGT1A1 のブロック1にある4つの遺伝子多型の頻度については、今回観測された各人種における頻度の信頼区間は、今まで報告されていたそれぞれの遺伝子多型の各人種における頻度を含んでいた。

3'-UTR の遺伝子多型は、mRNA の安定性に関与している可能性があるとして報告されている。^{14, 15)} ブロック2は *UGT1A1* のエクソン2~5 を含んでいるが、同部位は、*UGT1A* の他の分子種と共有されるエクソンである。今回対象にした3つのSNPは、従って、*UGT1A1* のみならず、すべての *UGT1A* 分子種の機能に影響を及ぼす可能性がある。Acuna らは、1941C>G の変異があると、主として *UGT1A9* で代謝される *tolcapone* による肝毒性が緩和される傾向にあると報告した。¹⁶⁾ しかし、佐井らは、同変異があるとイリノテカンの活性代謝物である SN-38 の代謝が抑制されると、⁶⁾ と相反する報告をしている。同アレルの *in vivo* における機能変化については、さらに検討が必要であるが、同部位における各SNPsの頻度は、人種間で差があった。

遺伝子多型と薬物動態や薬効・副作用との関連を検討する際には、個々のアレルとの関係だけではなく、1本のDNA上で連鎖したアレルの組み合わせ、すなわちハプロタイプとの関係を調べるのが有用であ