

## A. 研究目的

現在、医薬品開発のグローバル化が急速に進みつつあるが、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porter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porter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。

UDP グルクロノシル転移酵素 (UGT) は、投与された薬物又は代謝物を、水溶性の高いグルクロン酸抱合体に変換させることにより薬物の解毒化を担う酵素である。グルクロンサン抱合反応は、第 II 相の代謝の約 40% を占めている。<sup>1)</sup> ヒトの UGT は、構成するアミノ酸配列の一次構造の類似性から、UGT1A、UGT2A 及び UGT2B に分けることができ、UGT1A 及び UGT2B ではそれぞれ幾つかの分子種がクローン化されている。UGT1A 遺伝子は、UGT1A1、UGT1A3、UGT1A4、UGT1A5、UGT1A6、UGT1A7、UGT1A8、UGT1A9、UGT1A10 の 9 個の分子種が確認されており、この他

に、蛋白が確認されていない UGT1A2、UGT1A11、UGT1A12、UGT1A13 の pseudo gene が存在する。各 UGT1A 分子種の mRNA の大きさは約 1.6 kb であり、蛋白質は約 50 kDa、530 前後のアミノ酸からなる。UGT1A のエクソン 2~5 は各分子種に共通であり、基質結合部位と考えられるエクソン 1 だけが、互いに異なる。<sup>2)</sup> UGT1A サブファミリーの構造の一部を Fig. 1 に示した。

UGT1A1 は、フェノール類、アントラキノン・フラボン類、クマリン類など、幅広い化合物を基質としてグルクロン酸抱合を行う。生体成分の基質としては、アンドロジェン型ステロイドの代謝を担い、また、ビリルビンのグルクロン酸抱合を行う唯一の酵素である。<sup>2)</sup> さらに、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。<sup>3-5)</sup>

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。<sup>2)</sup> 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<sub>6>7</sub> 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エクソン 1 における変異 686C>A (P229Q, UGT1A1\*27)

も報告されている。<sup>6)</sup>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 の代謝活性が低下することが確認されている。<sup>7, 8)</sup> 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することができることを報告し、いくつかのハプロタイプが SN-38 の薬物動態やビリルビン・レベルと関連があることを見いだした。<sup>6)</sup>

以上より、*UGT1A1* に関してはハプロタイプと PK/PD との関連を検討することが重要と考えられたので、本研究では、-3279T>G、TATA ボックス内 TA リピート数の相違による多型、エクソン 1 における 2 つの変異 211G>A (G71R) と 686C>A (P229Q)、及び、3'-UTR における 3 つの SNPs をマーカーとして、日本人、白人種及び黒人種間で、ハプロタイプの構造と頻度を比較することとした。これらの遺伝子多型の位置を Fig. 1 に示した。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。また、研究の過程で、黒人種で新規 SNP、686C>T (P229L) が見出されたので、同 SNP が黒人種における *UGT1A1* の活性の変動に及ぼす影響を検討するために、*in vitro* 機能解析を行った。

## 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) パイロシークセンス法による遺伝子のタイピング：白人種及び黒人種の 3'-UTR の 3 箇所の SNPs を除くポジションの変異は、佐伯らの方法<sup>9)</sup>に従って、Table 1 に示したプライマーを用いてパイロシークセンス法により遺伝子型を同定した。なお、日本人の試料の 1941C/G については、増幅用プライマーセットには、(biotin-ATTTGAATATGTATCGTGCCC 及び CATTCATTCATTTACCTACACT) を、シークセンス用プライマーには (CAGTAGGGGCAGC) を用いた。

2) ダイデオキシ・シークセンス法：白人種及び黒人種の 3'-UTR の 3 箇所の SNPs については、日本人の試料の 1941C/G 同定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。<sup>10)</sup> 黒人種で見つかった新規 SNP、P229L については、Table 1 の B に示したプライマーを用いて、その塩基配列を確認した。

### (4) ハプロタイプ解析

各ポジションの遺伝型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<sup>11, 12)</sup> を用いて、人種ごとにディプロタイプを推定した。

#### (5) UGT1A1 の新規 SNP の *in vitro* 機能解析

1) プラスミドの構築：神野らの方法<sup>13)</sup> に修正を加えて、野性型と P229L の UGT1A1 を COS-1 細胞に発現させた。

pcDNA3.1 にクローニングした UGT1A1 cDNA を鋳型にして、Table 2 に示したプライマーを用いて 2 回 PCR 増幅を行った。<sup>14)</sup> 得られた断片は pDONR 201 Vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) にクローニングした。pDONR/UGT1A1-WT の配列を確認した後に、Table 2 に示した mutation primer を用いて QuickChange Multi Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) で 686C>T (P229L) の変異を導入した。pDONR/UGT1A1-WT 及び pDONR/UGT1A1-P229L にクローニングされた UGT1A1 cDNA を pcDNA-DEST40 にサブクローニングした。上記 vector を用いて、野性型及び P229L を COS-1 細胞へ導入した。各遺伝子について、各回 4 枚のディッシュを用いて遺伝子導入し、これを 3 回繰り返した。

Western Blotting 及び Real-time reverse transcription (RT)-PCR は、神野らの方法<sup>13)</sup> に従って、また、SN-38 を基質に用いた代謝活性の測定は埴岡らの方法<sup>15)</sup> に従って測定した。RT-PCR に用いたプライマーを Table 2 に示した。

#### (6) 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

##### (1) サンプル・サイズの妥当性

SNP (一塩基多型) の定義は、「1%以上の頻度で現れる」ものを指すことが多い。今回のサンプル・サイズは頻度が 1%程度の遺伝子多型を見逃さないために、「期待頻度の 1/3 の頻度で事象が起こるとしたときにサンプル中に 1 例事象が発生するようにサンプル・サイズを決める」という 3 倍ルールを適用し、1 人種あたりの試料数を 150 人 (即ち染色体として 300) とした。

このサンプル・サイズによる試験の精度を見積もった。母集団における変異型のアレル頻度を  $p$  で表すと、母集団から  $n$  個の試料を抜き取ってアレル頻度を調べるとき、サンプルのアレル頻度の標準誤差  $\sigma_p$  は

$$\sigma_p = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

で表される。n 個の試料からなるサンプルから、母集団における変異型のアレル頻度が  $\bar{p}$  と推定されたとき、真のアレル頻度  $p$  の 95%信頼区間は、次式で表される。

$$\bar{p} - 1.96\sigma_p \leq p \leq \bar{p} + 1.96\sigma_p$$

この式を用いて、推定値  $\bar{p}$  が 0.05、0.1 及び 0.2 のときに、真のアレル頻度の 95%信頼区間を、サンプル・サイズの大きさに対してプロットしたのが Fig. 2 である。サンプル・サイズ (染色体数) が 300 のときには、推定値  $\bar{p}$  が 0.05 では、信頼区間は  $\pm 0.025$  であり、一方、推定値  $\bar{p}$  が 0.2 では、信頼区間は  $\pm 0.04$  程度であった。図には示さなかったが、信頼区間は  $\bar{p}$  の値が 0.5 に近いほど広くなる傾向にあり、 $\bar{p}=0.4$  においてはその信頼区間の巾は  $\pm 0.048$  であった。上記より、サンプル・サイズが 300 のときには、アレル頻度の推定誤差は 0.05 以下に止まると言える。また、有意水準 0.05、各集団のサンプル・サイズが 300 の検定で、人種間でアレル頻度に 0.1 の差があるときの検出力を、StatXact (Cytel Software Corporation, Cambridge, MA) で計算した結果を Table 3 に示した。一方の母集団のアレル頻度が 0.2 以下の場合には 0.8 以上の検出力が確保できる。アレル頻度が 0.2 以上では検出力は下がるが、最も低くて 0.7 弱であった。以上より、研究の目的に照らし合わせ、今回のサンプル・サイズは、ほぼ満足できると判断できた。

## (2) 各遺伝子多型の頻度

本研究のサンプルから推定された UGT1A1 の各ポジションのアレル頻度、信頼区間、及び、 $\chi^2$ -検定による人種間におけるアレル発現頻度又は多型の分布パターンの差の検定結果を Table 4 に示す。

### 1) -3279T>G の頻度

UGT1A1 のエンハンサー領域にある PBREM に生じる変異、-3279T>G は UGT1A1\*60 と名付けられている。黒人種においては、約 90%がリファレンス・シーケ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・シーケ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・シーケ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 ( $\chi^2$ 検定、 $p < 0.0001$ )。

### 2) TATA ボックス内の TA リピート数

UGT1A1 のプロモータ領域である TATA ボックス内に生じる TA リピート数の違いによる多型は 4 種類報告されており、野性型の繰り返し数は 6 である。この他に、繰り返し数 5、7 及び 8 が知られている。日本人では、(TA)<sub>6</sub> と (TA)<sub>7</sub> のタイプしか観察されず、後者のアレル頻度は 0.097 であった。白人種では、(TA)<sub>7</sub> の頻度は 0.388 と日本人よりも高く、(TA)<sub>5</sub> 及び (TA)<sub>8</sub> が、それぞれ頻度は 0.017 及び 0.007 と低いが、検出された。一方、黒人種では、(TA)<sub>6</sub> の頻度は 0.446 と 3つの人種間では最も低く、(TA)<sub>7</sub> の頻度は (TA)<sub>6</sub> と同じであり、また、(TA)<sub>5</sub> 及び (TA)<sub>8</sub> の頻度はそれぞれ 0.044 と 0.064 と 3つの人種間では最も高かった。

TATA ボックス内の遺伝子多型の発現頻度の分布パターンには、人種間で有意の差が検出された ( $p < 0.0001$ )。

### 3) 211G>A の頻度

日本人の Gilbert 症候群の患者に多いとされる 211 番目の塩基が G より A に変わる変異は、UGT1A1\*6 と名付けられており、グリシンからアルギニンへアミノ酸が置換される (Fig. 1)。この位置に関しては、黒人種では全く、白人種においても非常に希にしか変異型は存在しなかったが、日本人では変異型のアレル頻度の推定値は約 16% であった。日本人では野性型をヘテロ及びホモで持つヒトの比率は、それぞれ、0.25 前後及び 0.02~0.03 と計算されるが、今回の検体ではホモは 6 名おり、その確率は 0.020 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 ( $\chi^2$  検定、 $p < 0.0001$ )。

### 4) 686C>A の頻度

翻訳開始点より 686 番目の塩基が C から A に変わる変異は UGT1A1\*27 と名付けられており、プロリンからグルタミンへのアミノ酸置換を伴う (Fig. 1)。この変異は、Gilbert 症候群及び治療を要する中程度の高ビリルビン血症を引き起こす Crigler-Najjar 症候群タイプ II の日本人患者から見つかっている。<sup>16)</sup> UGT1A1\*27 は、白人種では全く観察されなかった。日本人では、150 人中 1 名がヘテロで UGT1A1\*27 を有していた。黒人種では既知の変異、686C>A (P229Q) は見つからなかったが、1 検体において別の塩基置換 (C から T への置換) がパイロシーケンス法で検出された。この変異は、ダイレクト・シーケンス法によっても確認された (Fig. 3)。この塩

基変換は、プロリンからロイシンへのアミノ酸置換 (P229L) をもたらす。なお、このポジションの変異は、いずれの人種においても極めて稀か、検出されなかったため、発現頻度の人種間差はなかった。

### 5) 3'-UTR における SNPs

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、<sup>9)</sup> このうち 1 箇所 (1941C>G) についてのみ、パイロシーケンス法で遺伝子型を決定した。日本人においては 1941 以外のポジションの SNPs の頻度は、B41C>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は、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、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 ( $p < 0.0001$ )。

### (3) ハプロタイプ構造と頻度の人種差

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。<sup>9)</sup> 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 5)、ブロック2では6種 (Table 6) 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例見つかった。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<sup>6,17)</sup>、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 5)

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 6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例ほど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。

#### (4) P229の *in vitro* 機能解析

本研究において、黒人種の検体から *UGT1A1* の新規 SNP、686C>T (P229L) が見出されたので、これをCOS-1細胞に発現させて機能解析を行った。Western Blottingの結果をFig. 4に示した。P229Lでは2つのスポットが検出されたので2つのスポットの和を、P229Lのタンパク発現量とした。P229Lの *UGT1A1* タンパク発現量は、野性型に比較して約60%であり、この差は統計的に有意であった。なお、既知のSNPであるP229Qの蛋白発現量は野性型と同程度であったと報告されている。<sup>13)</sup> *UGT1A1* の mRNA レベルを比較した結果をFig. 5に示した。mRNAの発現レベルには、両者で有意差はなかった。Fig. 6は、抗ガン剤イリノテカンの活性代謝物である

SN-38 を基質として、野生種と P229L 種の酵素活性を比較した結果である。Table 7 に野生種と P229L 種の kinetic parameter を示した。タンパク量で補正した後のクリアランス値 ( $V_{max}/K_m$ ) より、P229L のクリアランスは野生種の約 3% であった。ちなみに、既知 SNP である P229Q のクリアランスは野生種の 50% 程度であったので、<sup>13)</sup> P229L の活性の低下は P229Q よりも著しかった。

#### 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各人種におけるそれぞれの遺伝子多型の頻度を含んでいた。

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る場合が多いと言われている。実際に、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、本研究においてもそれが確認されたので、これらの 2 箇所のアレルの PK/PD に及ぼす影響を、独立で検討することは好ましくないことは明かである。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、人種間の差を検出することができた。今回頻度は低いが白人

においても、211G>A が検出されたが、白人における同アレルを含むハプロタイプの構造は明らかにできなかった。

著者のグループの研究では、ハプロタイプ\*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していることを明かにしてきた。<sup>6)</sup> 我が国における標準的なイリノテカンの用法・用量は、1 週間間隔での 100 mg/m<sup>2</sup> 又は 2 週間間隔での 150 mg/m<sup>2</sup> 投与であるため、また、副作用に対する処置法が確立されてきたため、現在では重篤な副作用が発症することは少ないが、米国では 3 週間間隔による 350 mg/m<sup>2</sup> 投与が主流であり、文献によれば今なお重篤な副作用がしばしば観察されている。<sup>21)</sup> 現在、FDA ではイリノテカンの治療への遺伝子多型診断の導入を検討中であると伝聞するが、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る。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。

ブロック 2 における 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<sup>18,19)</sup> と報告されている。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。<sup>20)</sup>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、<sup>9)</sup>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。

今回、黒人種でUGT1A1\*27と同一のポジションで別のタイプの変異、686C>Tが検出された。この変異はアミノ酸の置換を伴う(P229L)。COS-1細胞を用いた*In vitro*機能解析の結果、UGT1A1の変異種686C>TのmRNAのレベルは野生種とほぼ同程度であったのに対し、タンパク発現量が有意に低下していたのは、生成したタンパクの安定性が低いことが考えられた。また、P229LのWestern blottingでスポットが2つに分かれたことは、翻訳後修飾に違いのあるタンパクが生成していることを示唆し、このことがタンパクのコンフォメーションの変化を来し著しい活性低下の要因のひとつとなっていることが推測できた。P229Lは既知の変異UGT1A1\*27(P229Q)よりも機能低下の程度は著しく、*in vivo*において、Gilbert症候群やCN症候群との関連が懸念される。

#### E. 結論

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以上の確からしさ

で推定できた。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している。また、新規SNP、P229Lは、黒人種におけるUGT1A1の機能低下の原因のひとつに成り得ることが示唆された。

#### 謝辞

本研究へご協力いただいた協力研究者の頭金正博博士、黒瀬光一博士、神野透人博士、斎藤嘉朗博士、香川聡子研究員及び佐伯真弓研究員に深謝致します。

#### 参考文献

- 1) W.E. Evans et al., *Science*, 286, 487 (1999).
- 2) R.H. Tukey & C.P. Strassburg, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 40, 581 (2000).
- 3) L. Iyer et al., *Pharmacogenomics J.*, 2, 43 (2002).
- 4) Y. Ando et al., *Cancer Res.*, 60, 6921 (2000).
- 5) F. Innocenti et al., *Pharmacogenetics*, 12, 725 (2002).
- 6) K. Sai et al., *Clin. Pharm. Ther.* 75, 501, 2004.
- 7) L. Iyer et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 65, 576 (1999).
- 8) J-F Gagne et al., *Mol. Pharmacol.*, 62, 608 (2002).



- 9) M. Saeki et al., Clin. Chem., 49, 1182 (2003).
- 10) M. Saeki et al., Drug Met. Pharmacokinet., 17, 488 (2002).
- 11) M. Stephens et al., Am. J. Hum. Genet., 73, 1162 (2003).
- 12) M. Stephens et al., Am. J. Hum. Genet., 68, 978 (2001).
- 13) H. Jinno, et al., Drug Metab. Dispos., 31, 108 (2003).
- 14) H. Jinno, et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 306, 688 (2003).
- 15) N. Hanioka, et al., Xenobiotica 31, 687 (2001).
- 16) O. Koiwai et al., Hum. Mol. Genet., 4, 1183 (1995).
- 17) C.S. Huang et al., Pharmacogenetics. 10, 539 (2000).
- 18) D.A. Day and M.F. Tuite. J. Endocrinol., 157, 361 (1998).
- 19) B. Conne, et al., Nat. Med. 6, 637 (2000).
- 20) G. Acuna, et al., Pharmacogenomics J. 2, 327 (2002).
- 21) E. Marcuello, et al., Br. J. Cancer, 91, 678 (2004).

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) M. Saeki, Y. Saito, H. Jinno, M. Tohkin, K. Kurose, N. Kaniwa, K. Komamura, K. Ueno, S. Kamakura, M. Kitakaze, S. Ozawa and J. Sawada. Comprehensive *UGT1A1* genotyping in a Japanese population by Pyrosequencing. Clin. Chem., 49, 1182 - 1185 (2003).
  - 2) N. Kaniwa, K. Kurose, H. Jinno, 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.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 黒瀬光一、頭金正博、長谷川隆一、佐伯真弓、斎藤嘉朗、越前俊宏、家入一郎、千葉寛、鹿庭なほ子. *UGT1A1* 遺伝子多型の人種差. 日本薬学会第 124 年会、大阪、2004.3.
  - 2) Nahoko Kaniwa, Masahiro Tohkin, Koichi Kurose, Hideto Jinno, Yoshiro Saito, Toshiko Tanaka-Kagawa, Mayumi Saeki, Ryuichi Hasegawa, Ethnic differences in allele frequencies of genotypes in *UGT1A1*. The 7<sup>th</sup> International ISSX Meeting, Vancouver, 2004. 8.
  - 3) Nahoko Kaniwa, Masahiro Tohkin, Kouichi Kurose, Hideto Jinno, Yoshiro Saito, Toshiko Tanaka-Kagawa, Mayumi Saeki, Jun-ichi Sawada, and Ryuichi Hasegawa, Ethnic differences in allele frequencies of genotypes in *UGT1A1* and glucuronidation

activity of a novel SNP 686C>T  
(P229L). 第 19 回日本薬物動態学会年  
会、金沢、2004. 11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

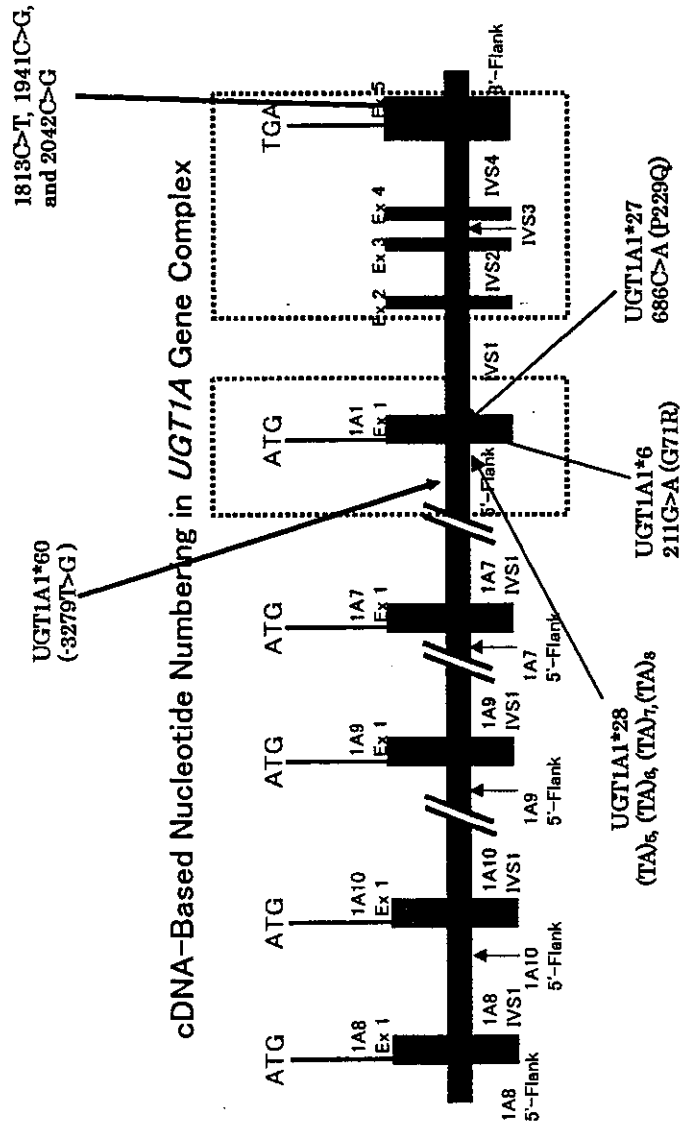


Fig. 1 A schematic structure of UGT1A subfamily and genetic polymorphisms of UGT1A1 analyzed in this study

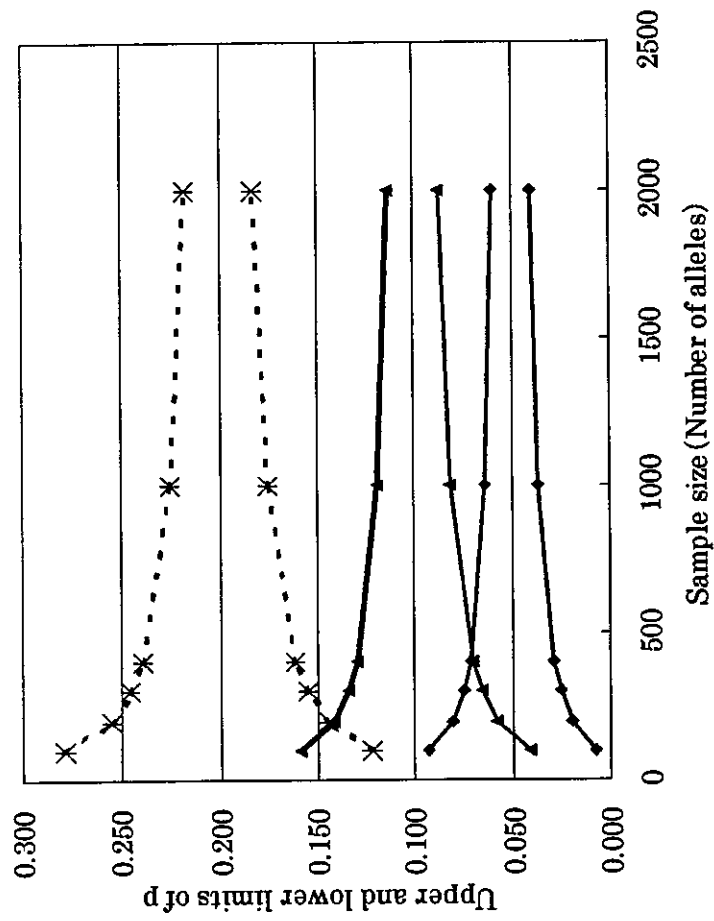


Fig. 2 Effects of sample sizes on the confidence intervals of allele frequency  $p$

- .....\*.... limits for 0.2 of estimated  $p$
- ▲— limits for 0.1 of estimated  $p$
- ◆— limits for 0.05 of estimated  $p$

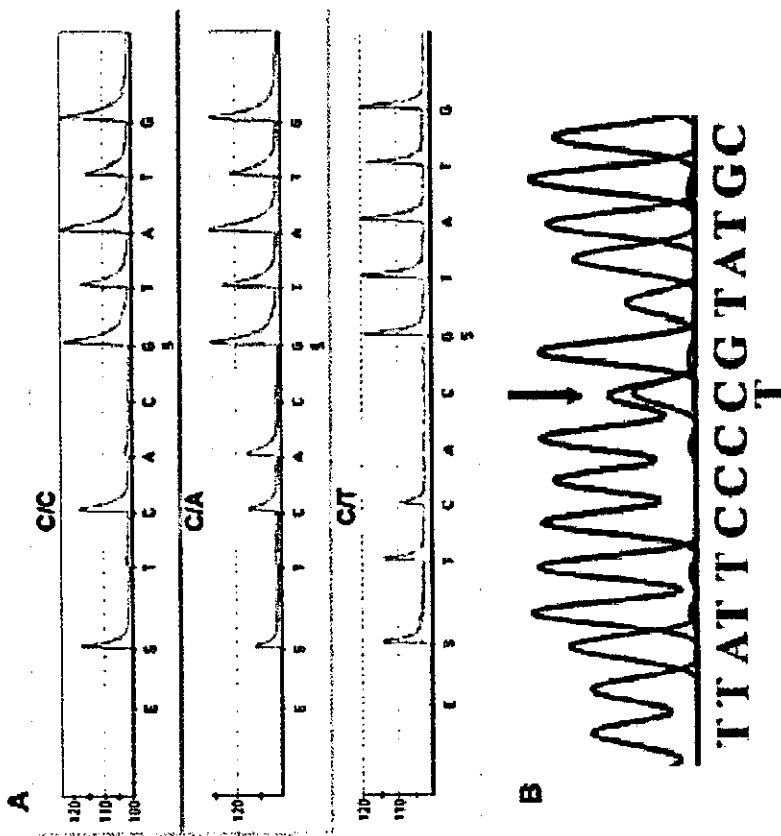
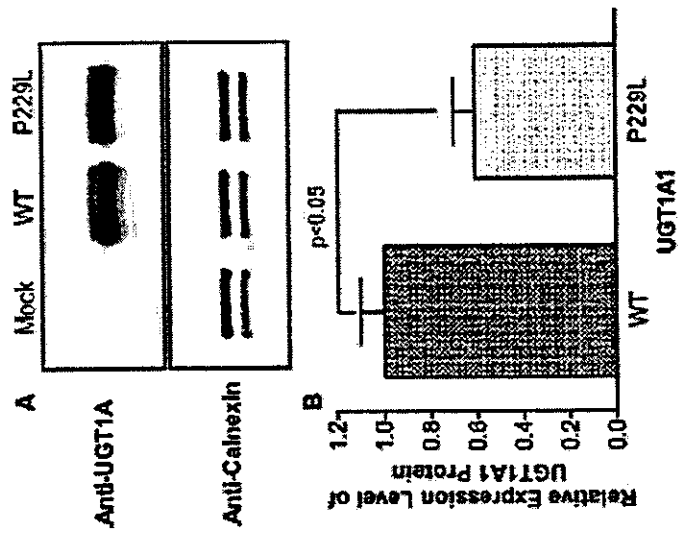


Fig. 3 position 686. A, pyrograms for UGT1A1 686C/C, 686C/A, and 686C/T. The sequence to be analyzed is underlined in GACGTGGTTATTCCCCCGTATG. The first T and the fourth C, nucleotides unrelated to 686C/A, were added to estimate the background value. Top, a pyrogram obtained from a Japanese individual carrying homozygous 686C; middle, a pyrogram obtained from a Japanese individual with 686C/A; bottom, a pyrogram obtained from an African-American with 686C/T. B, the nucleotide sequence around the 686th nucleotide in exon 1 is shown (the A of the translational start codon of the cDNA is designated as 1). The sequence of the sense strand obtained from the same individual as in the bottom of A is shown. The arrow indicates the nucleotide substitution position.



**Fig. 4** Expression of wild-type and variant P229L UGT1A1 in COS-1 cells.  
**A;** Western Blot.  
**B;** The average expression level of UGT1A1 proteins detected by Western blot (mean  $\pm$  S.E.M. from three independent preparations)

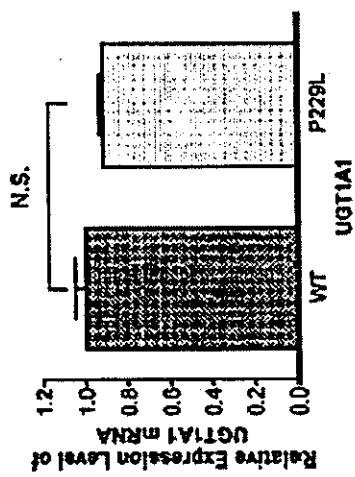


Fig. 5 Quantification of UGT1A1 mRNA by real-time RT-PCR in COS-1 cells transfected with wild-type and variant P229L UGT1A1 (mean  $\pm$  S.E.M. from three independent preparations).

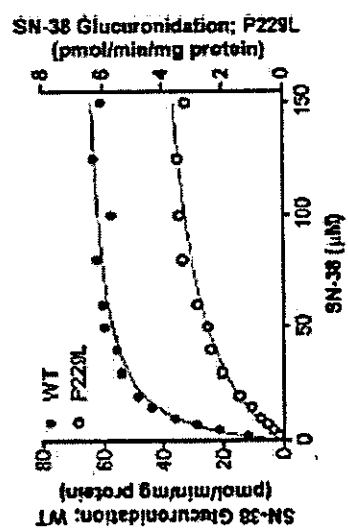


Fig. 6 Representative Michaelis-Menten kinetics of SN-38 glucuronidation by expressed wild-type (●) and variant P229L (○) UGT1A1 in COS-1 cells. The solid line indicates predicted glucuronidation using Michaelis-Menten kinetic parameters estimated by nonlinear regression analysis.



Table 1 Primers used for pyrosequencing and dideoxy sequencing

A. Pyrosequencing		Polymorphism		Primer name		Sequence, 5' to 3'	
Amplification	-2279T>G		UGTCARLSE3				TTAACCAAGAACATTCIAKCGG
	TA repeat		GLAICARRIS*				b-TGCTGTCCCAACTTC
	211G>A (G71R), 247T>C (F83L)		DTATAF*	UGT1A1-TATA			b-TCCCTGCTACCTTTGTGGAC
	680C>A (P229Q)		bG71RF*	G71RH			GAGBTCCGCCCTGCTCTACT
Sequencing	Forward	-3279T>G	UGT1A1D-Left				b-CAGCAGAGGGGCATCAAAI
	Reverse	TA repeat	bP229QR*				CAAAAGCATTAATGCCCGAGAC
	Reverse	211G>A (G71R)					TTTCTGTCCGAGGTGGTTTA
	Reverse	247T>C (F82L)					b-GGCCCTAGCGTAA1GCTTCA
	Forward	680C>A (P229Q)	1A1CAR1SeqF				CCAGCGGTAGAGTTCAGT
B. Sequencing	First amplification	Forward	UGT1A1-TATA SeqR				TCCGCCCTCTCCTACTTATAT
		Reverse	UGT1A1-G71R-SeqR				TTCCAGGTGTAAATGCTC
	Second amplification	Forward	F83L-SeqR				ACATCCCTCCCTTTGGG
		Reverse	UGT1A1-229SeqF				GACC1GGT1TAT1TCC
		Reverse	UGT1A1-CAR1-SeqZ				
		UGT1A1-CAR1-SeqZ				GGTGTGTGGAGTGGT1TAGT	
		UGT1A1-CAR1-SeqZ				AGAGGGAAATATGCSACAGAA	

Table 2 Primers used for expression of wild-type and variant UGT1A1s in COS-1 cells

A. Construction of pMaxid.1a.686C>T		Primer name	Sequence
First amplification	Forward	s1781_UGT1A1_F	5'-AAAAAG CAGGCTG CAAAGGCG CCAAGGCTGT-3'
	Reverse	s1782_UGT1A1_R	5'-AGAAAGCTGGTCTCAGTGGTCTTGCAATTTGGG-3'
Second amplification	Forward	s1781_Adaptor Primer	5'-GGG AGAAGTTTGTACAAAAG CAGGCT-3'
	Reverse	s1782_Adaptor Primer	5'-GGG AADACTTTGTADAGAAAG CTGGT-3'
Mutation		Mutation primer	5'-Fluoro-GCAGCTGTTTATTCCCTGATG CAAGCTTGGCTC-3'
B. Real-time reverse transcription (RT)-PCR			
	Forward		5'-TATTGTGCTACACCTGACGC-3'
	Reverse		5'-CTTTCACAGTCTCTTCTT-3'

**Table 3 Exact power for comparing two binomial populations  
(Type of test: Fisher's exact test, Type I error (Alpha) = 0.05, n1 = n2 = 300)**

$P_1$	$P_2$	Power
0.05	0.15	0.98
0.10	0.20	0.92
0.15	0.25	0.85
0.20	0.30	0.78
0.25	0.35	0.74
0.30	0.40	0.70
0.35	0.45	0.68
0.40	0.50	0.68
0.45	0.55	0.67

Table 4 Allele frequencies of genetic polymorphisms of *UGT1A1* in the three ethnic groups

Position	Change	Nucleotide	Amino acid	Ethnic group						P ( $\chi^2$ -test)
				African-American		Caucasian		Japanese		
				Number of heterozygotes/homozygotes <sup>a</sup>	Allele frequency (lower limit, upper limit)	Number of hetero/homo individuals <sup>a</sup>	Allele frequency (lower limit, upper limit)	Number of hetero/homo individuals <sup>a</sup>	Allele frequency (lower limit, upper limit)	
-3279	T>G			36/109 (300)	0.847 (0.806, 0.888)	65/50 (300)	0.550 (0.494, 0.606)	55/11 (300)	0.257 (0.208, 0.306)	p<0.0001
TA box	(TA)5			13/0 (298)	0.044 (0.021, 0.067)	5/0 (294)	0.017 (0.002, 0.032)	0/0 (300)	0.000	p<0.0001
	(TA)6			69/32 (298)	0.446 (0.390, 0.502)	77/48 (294)	0.588 (0.532, 0.644)	23/124 (300)	0.903 (0.870, 0.936)	
	(TA)7			65/34 (298)	0.446 (0.390, 0.502)	78/18 (294)	0.388 (0.332, 0.444)	23/3 (300)	0.097 (0.064, 0.130)	
	(TA)8			17/1 (298)	0.064 (0.000, 0.092)	2/0 (294)	0.007 (0.000, 0.017)	0/0 (300)	0.000	
211	G>A	G71R		0/0 (300)	0.000	2/0 (300)	0.007 (0.000, 0.016)	35/6 (300)	0.157 (0.116, 0.198)	p<0.0001
686	C>A	P229Q		0/0 (298)	0.000	0/0 (300)	0.000	1/0 (300)	0.003 (0.000, 0.009)	p=0.405
	C>T	P229L		0/1 (298)	0.003 (0.000, 0.009)	0/0 (300)	0.000	0/0 (300)	0.000	
1813	C>T			61/22 (300)	0.350 (0.296, 0.404)	54/6 (300)	0.220 (0.173, 0.267)		Not determined	p<0.0001
1941	C>G			43/6 (300)	0.183 (0.1393, 0.2227)	47/1 (300)	0.163 (0.121, 0.205)	25/2 (300)	0.097 (0.064, 0.130)	p=0.0074
2042	C>G			68/23 (300)	0.380 (0.325, 0.435)	60/6 (300)	0.240 (0.192, 0.288)		Not determined	p<0.0001

<sup>a</sup> Values in parenthesis are numbers of chromosomes determined.