

Z00500199A

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

「テーラーメイド医療用全自動DNAチップ診断機器の開発」  
に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 源間 信弘

平成 18年 4月

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

「テーラーメイド医療用全自動DNAチップ診断機器の開発」  
に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 源間 信弘

平成 18年 4月

目 次

I. 総括研究報告

テーラーメイド医療用全自動DNAチップ診断機器の開発に関する研究	1
源間信弘	

II. 分担研究報告

1. テーラーメイド医療用DNAチップおよび全自動診断機器の開発に関する研究	4
源間信弘	
2. 薬物動態予測用DNAチップの開発に関する研究	9
東 純一	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	15
---------------------	----

I V. 研究成果の刊行物・別刷	16
------------------	----

総括研究報告書

「テーラーメイド医療用全自動 DNA チップ診断機器の開発に関する研究」

主任研究者 源間 信弘 （株）東芝 研究開発センター 事業開発室 技監

研究要旨：我々は、テーラーメイド医療の実践を加速するために、電気化学的な DNA 検出技術に基づく、迅速、安価、高信頼性の DNA チップおよび全自動 DNA チップ診断機器を目指している。本研究では、全自動 DNA チップ診断機器で用いる使い捨てカセットおよび制御機構の試作を行い、マウス血液を使ったモデル系でその動作を検証した。また、代表的な薬物代謝酵素「CYP2C9」の遺伝子多型を解析するための DNA チップを新たに開発し、臨床検体を使って実用性を評価した。

分担研究者：

東 純一

大阪大学大学院薬学研究科 教授

A. 研究目的

医薬品の有効性や副作用発現の個体差を予測するために、薬物代謝酵素や薬物標的分子の遺伝子多型の判定や、特定の遺伝子発現量の変動解析に関するデータが蓄積されつつある。しかしながら、これらの遺伝子情報に基づくテーラーメイド医療はまだ実用化されていない。原因の一つには、臨床応用に向けての研究が概して膨大な時間と経費を要する点にある。また、既存の遺伝子解析機器は非常に高価で、尚且つ専門性が必要なため、一般の医療現場で使うにはハードルが高い。更に個人の遺伝子情報の保護に関しても、現状の対応は充分とは言えない。これら諸因から、遺伝子診断が臨床現場で有効活用されるには至っていない。このような状況下、2005年3月にFDAから、Guidance for

industry “Pharmacogenomic Data Submissions”が公表され、医薬品開発時および市販後臨床試験内での検討が本格的に行われ始めた。本邦でも2005年3月に厚労省から“医薬品の臨床試験におけるファーマコゲノミクスの利用指針の作成に係る行政機関への情報の提供等について”が通知されるなど、テーラーメイド医療に向けての整備が進み始めている。

本研究は、テーラーメイド医療の実践を加速するために、迅速、安価、高信頼性の DNA チップおよび全自動 DNA チップ診断機器を開発することを目的とする。

B. 研究方法

（1）全自動 DNA チップ診断機器の開発

主任研究者らが開発した電流検出型 DNA 解析技術および完全密閉型構造の反応容器をベースに、今年度は全自動 DNA チップ診断機

器で用いる使い捨てカセットおよび検査装置（制御機構）の試作を行い、マウス血液を使ったモデル系で基本的な機能検証を行った。

## （2）薬物動態予測用 DNA チップの開発

全自動 DNA チップ診断機器で測定する検査項目として、代表的な薬物代謝酵素 CYP2C9 の遺伝子多型を解析するための電流検出型 DNA チップを開発し、その実用性を臨床検体を使い評価した。CYP2C9 は抗凝血薬のワルファリンなどを代謝する酵素として知られており、テーラーメイド医療を実現するための検査項目として、その有用性は非常に高いと考えている。

また、新たな検査項目の開発に向けて、臨床研究で候補遺伝子の探索を行い、DNA チップ化に有望な遺伝子および多型部位の絞込みを行った。

### （倫理面への配慮）

本研究への参加ボランティアに対しては、インフォームド・コンセントを文書で行う。また、遺伝子解析を含む臨床研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省 告示第 1 号）」に従い、実施施設内または然るべき機関に所属する倫理委員会において研究計画の承認を受けるものとする。

## C. 研究成果

### （1）全自動 DNA チップ診断機器の開発

昨年度決定した仕様を基に、今年度は全自動 DNA チップ診断機器で用いる使い捨てカセットの試作・機能検証を中心に検討を行った。試作したカセットは大きさが約 5×7×2cm で、サンプル注入部、試薬保管部、増幅反応部、DNA チップ、送液流路などから構成されており、サンプル注入以降は完全密閉されコンタミ

ネーションの発生を抑制する構造になっている。また、試作カセットを使った全自動検査を検証するために、温度制御部、送液制御部、電流検出部などから構成される検査装置の第 1 次試作機も併せて開発した。

今回、全自動機器で用いる増幅法としては①増幅の安定性に優れている（血液中の成分による障害を受けにくい）、②0.5～1 時間という短時間での増幅が可能、③増幅産物量が多い、④等温増幅のため装置開発が容易、等の理由から、LAMP 増幅法を採用することにした。また、ヒト血液を使った実験に先立ち、モデル系としてマウスの Cyp2c29 および Cyp2c39 の検出系を立ち上げ、試作した全自動カセットおよび検査装置の動作確認を行った。マウス血液（数百 nL）を添加した全自動カセットを検査装置にセットし、全ての工程を自動で制御した結果、血液添加から解析まで約 2 時間で特異的な検出が確認できた。

最終年度は、信頼性、操作性などの改良を行い、大阪大学での実証試験に繋げる。

### （2）薬物動態予測用 DNA チップの開発および基本特性の検証

昨年度の、「NAT2、CYP2C19、CYP2D6」チップの開発に引き続き、新たに CYP2C9 解析チップを開発した。日本人の場合は 2 つの多型でほぼ 100% をカバーできると報告されているので、今回は 1075A/C の一塩基多型（SNP）部位を解析対象にした。今回、全自動検査装置で LAMP 法を採用したのに合わせて、CYP2C9 の遺伝子多型検出においても、LAMP 増幅条件を検討した。CYP2C9 と CYP2C19 はホモロジーが高く、特異的なプライマーのデザインには苦戦したが、結果的には約 1 時間で増幅可能なプライマーを決定することができた。また、1075A/C の SNP は 2 塩基置換タイプであることから、SNP 当たりそれぞれのア

レルに対応する 2 種類のプローブを固定化した DNA チップを開発した。今回使用したチップでは、データの信頼性を確保するために 1 種類のプローブにつき 4 電極以上を割り当てた。開発したチップの特性を、先ず Coriel Cell Repository から購入した市販ゲノムを用いて評価した。その結果、全ての遺伝子型に特異的な検出が確認できた。続いて、分担研究者である大阪大学大学院薬学研究科において、臨床検体を用いた実用性の評価を行った結果、従来法と判定結果が一致し、精度良く多型判定が行えることが検証できた。

また、今後の開発方針として、これまでの薬物代謝酵素に加え、薬効を予測する標的分子の遺伝子多型の判定を可能にすることで、「薬物動態予測」から「疾患別薬効予測」に対応しうる DNA チップへとバージョンアップを試みることにした。具体的には、「血栓症薬効予測チップ」として、ワルファリンの代謝酵素 CYP2C9 とその標的分子であるビタミン K エポキシド還元酵素複合体 1 (VKORC1)、また、「消化器疾患薬効予測チップ」として、プロトンポンプインヒビターの代謝酵素 CYP2C19 とインターロイキン 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 多型をそれぞれ同時に判定可能な DNA チップの開発などを候補にあげた。

#### D. 考察

全自動 DNA チップ診断機器の開発では、カセットおよび制御系の試作機を完成させ、マウス血液を用いたモデル系で機能検証を行った。

また、薬物動態予測用 DNA チップの開発では、CYP2C9 解析用チップを開発し、臨床検体を使った評価で実用性を検証することができた。

今後、臨床診断機器としての信頼性向上に向けて、更に多数の臨床検体を使った評価を行うと共に、検出条件、判定アルゴリズムの最適化

を進める。

#### E. 結論

中間年度の目標は、ほぼ計画通りに達成することができた。最終年度は、全自動 DNA チップ診断機器の $\beta$ 機を完成させ、大阪大学での実証試験を成功させたい。

#### F. 健康危険情報---特になし

#### G. 研究発表

1. 論文発表--- (省略)
2. 学会発表--- (省略)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許 (出願) --- (省略)
2. 実用新案---なし
3. その他---なし

分担研究報告書

「テーラーメイド医療用 DNA チップおよび全自動診断機器の開発に関する研究」

主任研究者 源間 信弘 東芝 研究開発センター 事業開発室 技監

研究要旨：本研究では、全自動 DNA チップ診断機器で用いる使い捨てカセットの試作・機能検証を行った。試作したカセットは大きさが約 5×7×2cm で、サンプル注入部、試薬保管部、増幅反応部、DNA チップ、送液流路などから構成されている。核酸増幅法として LAMP 法を用いることで、全自動 DNA チップ診断機器の小型化、処理の短時間化に目処が付き、マウス血液を使ったモデル系で基本動作を検証することができた。また、代表的な薬物代謝酵素「CYP2C9」の遺伝子多型を解析するための DNA チップを新たに開発した。

A. 研究目的

本研究では、テーラーメイド医療の実践を加速するために、簡便、迅速、安価、高信頼性の医療用 DNA チップおよび全自動 DNA チップ診断機器の開発を目的とした。

B. 研究方法

（1）全自動 DNA チップ診断機器の開発

昨年度決定した仕様を基に、今年度は全自動 DNA チップ診断機器で用いる使い捨てカセットの試作・機能検証を中心に検討を行った。まず、カセットで使用する試薬の保存性試験、カセット構成材料との親和性試験を行い、試薬組成、試薬保存方法の決定およびカセット構成材料を選定した。また、実際に計測を行うための検査装置（制御機構）の第 1 次試作機も併せて試作した。

また、本プロジェクトでは、ヒトの血液を試料に用いて DNA の全自動検出を検証することが最終目標であるが、ヒト血液は容易に入手できないことから、全自動の検査プロセス検証の為に、マウス血液をモデルにした実験系を立ち

上げた。

（2）薬物動態予測用 DNA チップの開発

薬物動態予測用 DNA チップとして、今年度は新たに代表的な薬物代謝酵素である CYP2C9 の遺伝子多型を解析するための電流検出型 DNA チップを開発した。

解析サンプルとしては、血液から抽出したゲノム DNA を鋳型にして、遺伝子多型を含む領域を増幅した断片を使用した。

測定には、DNA チップ自動検査装置 GLH-2C301（試作機）、あるいは市販の電気化学測定装置を用いて行った。前者は、ハイブリダイゼーション反応からデータ解析までのプロセスを自動化しており、遺伝子増幅産物を DNA チップカセットに注入後、装置にセットするだけで DNA の解析が行える。

（倫理面への配慮）

本研究への参加ボランティアに対しては、インフォームド・コンセントを書面で行う。臨床材料を使った研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析

研究に関する倫理指針」に従い、実施施設内または然るべき機関に所属する倫理委員会（含、東芝・研究開発センター倫理審査委員会）において研究計画の承認を受けるものとする。また、臨床材料提供者の個人情報が出漏しないよう、全て匿名化を行う。

## C. 研究成果

### (1) 全自動 DNA チップ診断機器の開発

#### (1)-1 カセットおよび制御系の試作：

昨年度決定した仕様を基に試作したカセットは、大きさが約 5×7×2cm で、サンプル注入部、試薬保管部、増幅反応部、DNA チップ、送液流路などから構成されており、サンプル注入以降は完全密閉されコンタミネーションの発生を抑制する構造になっている（図1）。また、試作カセットを使った全自動検査を検証するために、温度制御部、送液制御部、電流検出部などから構成される検査装置（制御機構）の第1次試作機も並行して開発した（図2）。

#### (1)-2 増幅法の検討：

昨年度までは DNA チップ検出の前工程で行っている核酸増幅として PCR 法での検討を進めて来たが、その中で課題も浮かび上がってきた。特に深刻だったのは、カセット内での増幅の再現性・安定性の問題である。我々は最終的には診断薬を目指しており、開発を進める上でこれらは非常に大きな課題であった。

一方で、我々は以前から PCR 法の代替として DNA チップと LAMP 法の組み合わせについて検討を進めており、その中で LAMP 法の優れた特性を実感していた。具体的には、①増幅の安定性に優れている（血液中の成分による阻害を受けにくい）、②0.5～1時間という短時間での増幅が可能、③増幅産物量が多い、④等温増幅のため装置開発が容易、等である。本研究の全自動検査装置で採用するか否かは、PCR 法に比べ実績が少ない点をどう判断するかにかかっていたが、信頼性さえ検証できれば問題

ないとの分担研究者からのアドバイスもあり、今回 LAMP 法を採用することになった。

#### (1)-3 試薬保存安定性の検討：

我々が開発している全自動検査装置の機構では、試薬もカセットに内蔵する構成となるため、内蔵された状態での試薬の保存安定性を評価する必要がある。LAMP 法採用の決定を受けて、使用する酵素 Bst polymerase、緩衝液などの試薬の保存試験を実施した。その結果、凍結保存であれば酵素と緩衝液を混合した状態であっても、1ヶ月以上に亘って活性低下が認められなかった。今後も継続して評価を行う予定であるが、カセット内に酵素を混合した状態で保存することができれば、カセット構造や制御機構をより簡単にすることが可能になると考えている。

#### (1)-4 モデル系の構築：

本研究では、ヒトの血液を試料に用いて DNA の全自動検出を検証することが最終目標であるが、ヒトの新鮮血は容易に入手できないことから、全自動の検査プロセス検証の為に、マウス血液をモデルにした実験系を立ち上げた。検出対象としては、ヒトの代謝酵素遺伝子 CYP2C9 とホモロジーの高いマウス Cyp2c29 およびヒトの CYP2C19 とホモロジーの高いマウス Cyp2c39 を選択した。まず、Cyp2c29 と Cyp2c39 のそれぞれを特異的に LAMP 増幅するための条件を決定し、増幅産物の有無（SNP ではない）を検出するための DNA チップを開発した。

#### (1)-5 全自動プロセスの検証：

モデル系が構築できたことから、続いてマウス血液からの全自動検査プロセスを検討した。まず、加熱処理のみで血液からのゲノム DNA の抽出工程を省くことができるか検討を行った。その結果、PCR 法と異なり、85～95℃、5分の加熱処理さえ行えば、再現性良く増幅可能であることが分かった。また、血液から直接増幅した LAMP 産物を DNA チップ上で反応さ



せたところ、若干信号強度の低下は見られるものの、血液成分などによる阻害は殆どなく、特異的な検出が可能であることを確認した。

#### (1)-6 全自動検査装置の動作検証：

以上得られた成果を基に、試作した全自動カセットおよび検査装置の動作確認を行った。マウス血液（数百 nL）を添加した全自動カセットを検査装置にセットし、全ての工程を自動で制御した結果、血液添加から解析まで約 2 時間でマウスの Cyp2c29 の特異的な検出が確認できた。

最終年度は、信頼性、操作性などの改良を行い、大阪大学での実証試験に繋げる。

### (2) 薬物動態予測用 DNA チップの開発および基本特性の検証

#### (2)-1 CYP2C9 解析チップの開発：

16 年度に、重要性の高い代謝酵素「NAT2、CYP2C19、CYP2D6」の薬物動態予測チップを開発したのに引き続き、今年度は新たに CYP2C9 解析チップとして、\*1 (wild type) と \*3 を識別するための電流検出型 DNA チップを開発した。日本人の場合は 2 つの多型ではほぼ 100% をカバーできると報告されているので、CYP2C9 チップでは 1075A/C の一塩基多型 (SNP) 部位を解析対象にした。

まず、1075A/C の SNP を含む断片の増幅条件を検討した。これまで開発した薬物動態予測チップでは、増幅法として PCR 法を採用していた。しかしながら、今回全自動 DNA チップ診断機器での増幅法として LAMP 法の採用を決めたことを受けて、CYP2C9 の遺伝子多型検出においても、LAMP 増幅に合わせたプライマー設計を行った。まず、公開されている LAMP 法プライマー設計ソフトウェアでプライマー配列のスクリーニングを行ったところ、CYP2C9 と CYP2C19 はホモロジーが高く、特異的なプライマーがデザインできなかった。そこで試行錯誤を繰り返した結果、約 1 時間で

増幅可能なプライマーを決定することができた。

次に、CYP2C9 解析用 DNA チップの開発を行った。1075A/C の SNP は 2 塩基置換タイプであることから、DNA チップ上には SNP 当たりそれぞれのアレルに対応する 2 種類のプローブを固定化した。今回使用したチップでは、データの信頼性を確保するために 1 種類のプローブに付き 4 電極以上を割り当てた。

#### (2)-2 CYP2C19 解析チップの開発：

これまで PCR 産物向けに開発してきた CYP2C19 チップについても LAMP 法への対応を図った。まず、636G/A、681G/A の 2 箇所の SNPs を検出対象にし、それぞれの SNP を含む 2 断片の LAMP 増幅条件を決定した。次に LAMP 産物に対応させた検出条件の検討を行った。LAMP 産物は PCR 産物と比較して様々な高次構造を形成するため、PCR で使用していたプローブや反応条件がそのままでは使用できなかった。そこで、LAMP 産物向けに新たに配列、プローブ長、反応条件などの最適化を行った。DNA チップ上には SNP 当たりそれぞれのアレルに対応する計 4 種類のプローブを固定化し特異性の検証を行った。

#### (2)-3 モデル系で検証：

上記の薬物動態予測用 DNA チップの特性を、臨床検体のモデル系として Coriel Cell Repository から購入した市販ゲノムを用いて評価した。その結果、全ての遺伝子型に特異的な検出が検証できた。また、同一基板内での再現性を評価したところ、CV 値で 5% 以下と良好な結果が得られた。ここで開発した DNA チップの実用性評価は、分担研究者である大阪大学大学院薬学研究科において行われた。

### D. 考察

全自動 DNA チップ診断機器の開発ではプロトタイプ 1 号機の試作が終了し、マウス血液を使ったモデル系で、基本的な動作を検証するこ

とができた。

また、薬物動態予測用 DNA チップの開発では、LAMP 産物に対応した検出系を構築し、市販ゲノムを使ったモデル系で良好な特性を検証することができた。

#### E. 結論

中間年度も目標をほぼ計画通り達成することができた。最終年度は全自動 DNA チップ診断機器の□機を完成させ、大阪大学での実証試験を成功させたい。

#### F. 研究発表

1. 論文、著書など---なし

2. 学会発表など

ISSCC (Feb 4-7 2006 @San Francisco)  
Development of CMOS-integrated DNA chip  
for quantitative DNA analysis

Nobuhiro Gemma, Hideyuki Funaki, Jun Okada, Sadato Hongo.

第 11 回ケミカルバイオチップ研究会、2005 年 12 月 22 日 (東京)

電流検出型 DNA チップ

橋本幸二、源間信弘

第 52 回日本臨床検査医学会、2005 年 11 月 17 日～20 日 (福岡)

電流検出型 DNA チップおよび自動検査装置  
による薬剤代謝酵素遺伝子の多型解析

伊藤桂子、中村奈緒子、本郷禎人、橋本幸二、  
古塚深雪、窪田竜二、福田剛史、大野雅子、  
東純一、源間信弘

第四回ナノサイエンスサマー道場、2005 年 8 月 16 日～18 日 (長野)

電流検出型 DNA チップの研究開発と事業化  
源間信弘

CEATEC JAPAN 2005、2005 年 10 月 4 日～  
8 日 (幕張)

電流検出型 DNA チップ

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許 (出願)

・特願 2005-300546 「核酸検出センサ、  
核酸検出チップ及び核酸検出装置」 大内  
真一

・PCT/JP2005/019358 「核酸検出センサ、  
核酸検出チップ及び核酸検出装置」 大内  
真一

・特願 2006-083293 「核酸検出カセット  
及び核酸検出装置」 本郷禎人、岡田純、  
大木健司、源間信弘

2. 実用新案---なし

3. その他---なし

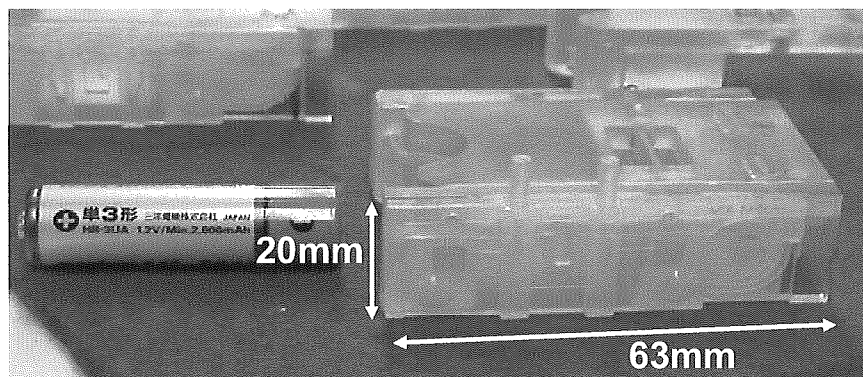


図1 全自動カセット

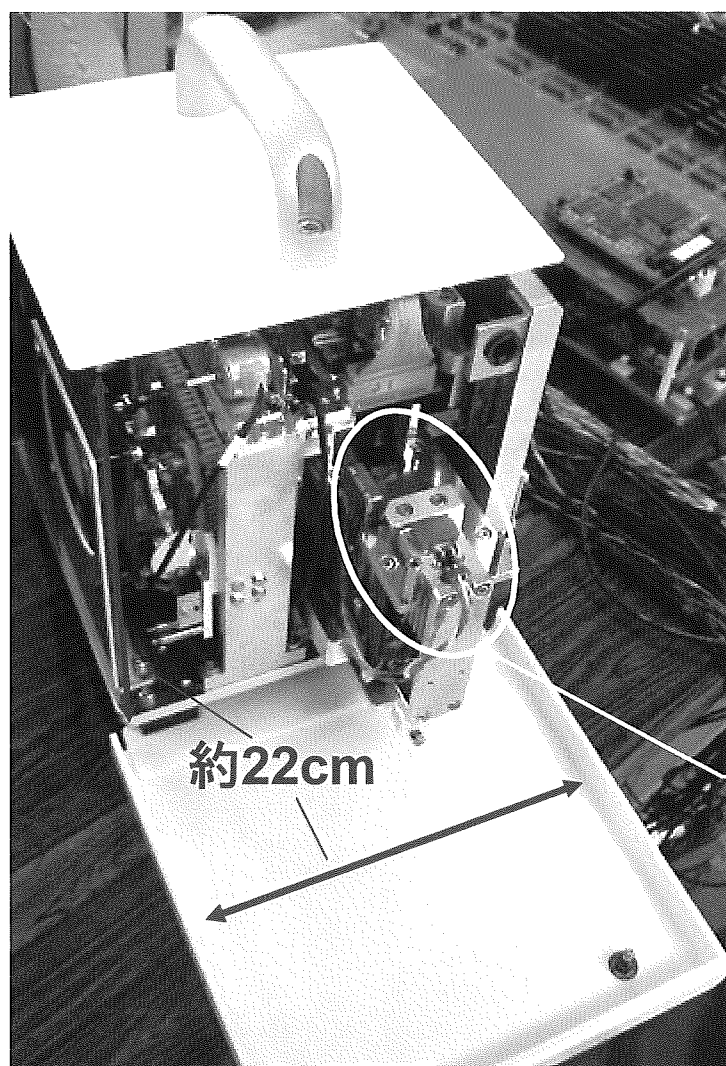


図2 全自動検査装置

分担研究報告書

## 「薬物動態予測用 DNA チップの開発に関する研究」

分担研究者 東 純一 大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学 教授

研究要旨： 本研究では、個別化適正医療の実践を加速させるため、簡便、迅速、安価、高信頼性の遺伝子多型判定用 DNA チップの開発を行う。今年度は、薬物代謝酵素遺伝子多型として新たにCYP2C9 判定用 DNA チップの仕様を検討した。また、全自動 DNA チップ診断機器の仕様を考慮し、遺伝子増幅法を PCR 法から LAMP 法へ移行し、薬物動態予測用 DNA チップの実用性の評価・検証を行った。さらに、臨床現場での利用を意識し、「薬物動態予測」から「疾患別薬効予測」に対応しうる DNA チップの仕様を検討し、DNA チップ開発のための基礎検討を行った。

### A. 研究目的

医薬品の有効性や有害作用発現の個人差を予測するためには、薬物代謝酵素や薬物標的分子の遺伝子多型の判定が有用であることを期待させるデータが蓄積されつつある。しかし現状では、薬効に関するゲノム情報が実地臨床の場で有効に利用されていない。一方、データの蓄積のみならず、蓄積されたデータの適正応用、すなわち遺伝子多型情報に基づいた個別化適正医療を実践する時機が来ていることに疑いの余地はない。本研究では、遺伝子多型情報に基づいた個別化適正医療の実践を加速させるため、簡便、迅速、安価、高信頼性の DNA チップおよび全自動 DNA チップ診断機器の開発を目的とする。

### B. 研究方法

(1) 薬物動態予測用 DNA チップの仕様の検討および新規候補遺伝子の探索

遺伝子多型の影響が明確にされており、且つ、臨床的に有用な分子として、昨年度までに薬物代謝酵素 NAT2、CYP2C19、CYP2D6 の DNA チップ開発に着手している。今年度は薬物代謝酵素として新たに CYP2C9 判定用 DNA チップの開発に着手した。DNA チップの仕様を決定するため、临床上重要な多型部位、すなわち個人の代謝酵素の活性を予測するために必要な多型を探索した。

また、上記薬物代謝酵素以外の新規コンテンツを有する DNA チップ開発を目的に、臨床研究の中で新たな開発候補遺伝子を探索した。

### (2) 薬物動態予測用 DNA チップの評価・検証

我々は、上記 4 種の薬物代謝酵素について遺伝子多型の臨床的意義を検討した経験を有している。シーケンスによりに保証され、また臨床的な検討において有用性の確認が可能であった PCR-RFLP 法、TaqMan 法等の従来

法による解析法および解析済検体を有している。これらを利用し、新規に開発する DNA チップとのクロスバリデーションを実施し、主任研究者らが作製した DNA チップの精度および実用性の評価を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究における遺伝子多型解析を行うために、大阪大学ヒトゲノム倫理委員会及び DNA サンプル提供医療機関の倫理委員会の承認を得た。DNA サンプル採取のための採血を行う前に、被験者には当該試験の内容を十分に説明した後、文書による同意を得た。被験者から採取した血液検体は、採取医療機関にて匿名化し、大阪大学に届けられ、DNA が精製された。DNA サンプルは大阪大学にて厳重に管理されている。

### C. 研究成果

(1) 薬物動態予測用 DNA チップの仕様の検討および新規候補遺伝子の探索

#### ・ 遺伝子増幅の手法

臨床現場で遺伝子多型判定を行う場合、全自動化が望ましいことを常々主張してきた。当初は、PCR 法による遺伝子増幅とそれに続く多型検出を一体化した全自動 DNA チップ診断機器の開発を目指していた。PCR 法による遺伝子増幅と多型検出を独立して行う方法により、数種の薬物動態関連遺伝子の多型検出が可能であることを昨年度に報告した。しかし PCR 法は、約 60°C~95°C の間で温度の上昇、下降を行う必要があり、検出部との一体化さらにはその小型化は困難であるとの判断に至った。一体化およびその小型化等には、等温増幅が可能な Loop-Mediated Isothermal

Amplification (LAMP) 法が有効であることを、主任研究者らに提案し、今年度より LAMP 法を用いた検討を積極的に進めることとなった。これまでの PCR 法より得た知見により、PCR 法から LAMP 法への移行は、比較的容易であった。

#### ・ NAT2 チップ

今年度は新たに、191G/A、341T/C の 2 箇所を解析対象とする DNA チップの開発を提案した。この 2 箇所の多型は、欧米人、黒人にアレル頻度約 5% で存在し、NAT2 活性低下が起こる *NAT2\*5C*、*\*14B* 遺伝子型の検出に必要である。分担研究者らは海外との共同研究を進めており、開発する DNA チップの市場を全世界に拡大するために、解析対象としておく必要があると判断した。

#### ・ CYP2C19 チップ

今年度は新たな判定遺伝子多型の提案は行わなかった。

#### ・ CYP2D6 チップ

今年度は新たな判定遺伝子多型の提案は行わなかった。

#### ・ CYP2C9 チップ

CYP2C9 は、抗血栓薬ワルファリンや糖尿病薬トルブタミドなどを代謝する薬物代謝酵素である。これらの薬物の常用量の投与により、出血や低血糖など重大な副作用を起こす患者が存在するため、CYP2C9 遺伝子多型判定による薬物動態予測は、安全な薬物治療を実践するために重要である。

CYP2C9 活性低下を引き起こす遺伝子型として、*CYP2C9\*2*、*\*3* が報告されている。日本人

では *CYP2C9\*3* を判定することで *CYP2C9* 活性の個人差をほぼ 100%説明できるとされている。我々は、*CYP2C9\*3* の判定に必要な 1075A/C 多型を解析対象とした DNA チップの開発を主任研究者らに提案した。

- ・ 新規 DNA チップ仕様の提案、及び候補遺伝子の提案

薬物代謝酵素に加え、薬効を予測する標的分子の遺伝子多型を判定可能な DNA チップ開発を提案し、「薬物動態予測」から「疾患別薬効予測」に対応しうる DNA チップへとバージョンアップを試みた。具体的には、「血栓症薬効予測チップ」として、ワルファリンの代謝酵素 *CYP2C9* とその標的分子であるビタミン K エポキシド還元酵素複合体 1 (*VKORC1*)、また、「消化器疾患薬効予測チップ」として、プロトンポンプインヒビターの代謝酵素 *CYP2C19* とインターロイキン  $1\beta$  (*IL-1\beta*) 多型をそれぞれ同時に判定可能な DNA チップの開発を提案した。

また我々は、うつ病に対して薬物反応性に関わる臨床研究を行い、トリプトファンヒドロキシラーゼ 2 (*TPH2*) 多型が重要であるという知見を得ている。この分子を「うつ病における個別化治療用 DNA チップ」として開発の候補に挙げた。

ここに挙げた遺伝子上に存在する遺伝子多型について、DNA チップ開発の準備段階として、PCR-RFLP 法、TaqMan 法等の従来法での多型判定法を確立し、各遺伝子型のパネルを製作した。

## (2) 薬物動態予測用 DNA チップの評価・検証

主任研究者らが開発した電流検出型 DNA 診断装置「Genelyzer」を我々の研究機関に設置

し、試作した DNA チップのクロスバリデーションを実施した。

- ・ 遺伝子増幅の手法

昨年度までに PCR 法でバリデーションを行ってきた DNA チップについては、遺伝子増幅のみを LAMP 法に移行し、チップ上の多型検出プローブは PCR 用のチップの仕様を踏襲することで対応した。

- ・ NAT2 チップ

昨年度に引き続き、新たに約 50 例の臨床検体について、PCR 法により遺伝子増幅を行い、481C/T、590G/A、857G/A の 3 遺伝子多型のクロスバリデーションを行った。全例において従来法による解析と一致した判定結果が得られた。

また、今年度は 191G/A、341T/C の 2 多型について、DNA チップ開発の準備段階として PCR-RFLP 法による多型判定法を新たに確立した。

- ・ *CYP2C19* チップ

約 30 例の臨床検体において、PCR 法での遺伝子増幅による *CYP2C19* チップの評価を行った。すなわち、636G/A、681G/A の 2 箇所の遺伝子多型についてクロスバリデーションを行い、全検体において従来法と一致する判定結果を得た。その後、遺伝子増幅を LAMP 法に移行し、少数の検体による評価と共に条件の調整を行った。従来法と判定結果が一致し、精度良く多型判定が行える条件を確定した。

- ・ *CYP2D6* チップ

*CYP2D6* の活性予測に最も重要な全欠損型 (\*5) の検出に関し、昨年度に PCR 条件の最

適化、プライマー位置の適正化などを行うことにより、精度良く CYP2D6 の全欠損を検出できる条件を見出している。現在、LAMP 法による全欠損型の検出の可能性を調査中である。

#### ・CYP2C9 チップ

活性の低下が起こる *CYP2C9\*3* を検出するため、1075A/C 多型について従来法と DNA チップとのクロスバリデーションを行った。

遺伝子増幅を LAMP 法で行い、少数の検体による評価と共に条件の調整を行った。従来法と判定結果が一致し、精度良く多型判定が行える条件を確定した。

#### D. 考察

(1) 薬物動態予測用 DNA チップの仕様の検討および新規候補遺伝子の探索

今年度は、薬物代謝酵素として CYP2C9 薬物動態予測用 DNA チップの開発を提案した。また、新規コンテンツの候補として挙げた遺伝子多型については、DNA チップ開発の準備段階として、多型判定法の確立、遺伝子型パネルの作製が完了しており、今後 DNA チップの作製、クロスバリデーションを実施する。さらに、我々は心不全の薬物治療、及び禁煙治療反応性に関わる臨床研究を行っており、今後、この成果をもとに新規候補遺伝子の提案を行っていく。

(2) 薬物動態予測用 DNA チップの評価・検証

全自動 DNA チップ診断機器の仕様に合わせ、遺伝子増幅を PCR 法から LAMP 法へ移行し、検討を行った。PCR 法によるクロスバリデーションは、一定の成果を得たと判断し、終了した。

#### E. 結論

薬物動態を予測するための DNA チップとして、NAT2、CYP2C19、CYP2D6、CYP2C9 の 4 項目について考案し、臨床検体での実用性評価を実施した。また、全自動 DNA チップ診断機器の仕様に合わせ、遺伝子増幅法として新たに LAMP 法を導入した。CYP2C19 と CYP2C9 については、LAMP 法により、従来法での判定と一致する結果を得ることができた。

さらに、新規コンテンツを有する DNA チップの開発を提案し、その基礎検討を終えることができた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nonen S, Okamoto H, Akino M, Matsui Y, Fujio Y, Yoshiyama M, Takemoto Y, Yoshikawa J, Azuma J, Kitabatake A. No positive association between adrenergic receptor variants of  $\alpha 2c$ Del322-325,  $\alpha 1$ Ser49,  $\alpha 1$ Arg389 and the risk for heart failure in Japanese population. *British J Clin Pharmacol.* 2005 60 (4) :414-417.

R. Kubota, M. Ohno, M. Yasunaga, S. Yokota, R. Maekura, J. Azuma. Tentative treatments for tuberculosis based on N-acetyltransferase gene polymorphism. *Jpn J Therapeutic Drug Monitoring* 2005 22 (4) : 336-340.

##### 2. 学会発表

第 26 回日本臨床薬理学会年会, 2005 年 12 月

1日～3日(大分)

Paroxetine および fluvoxamine 血中濃度の個体差に影響を及ぼす因子の解析

福田剛史, 加藤正樹, 山下恵実, 分野正貴, 福田和夫, 池永有香, 奥川学, 延原健二, 木下利彦, 東純一

第26回日本臨床薬理学会年会, 2005年12月1日～3日(大分)

抗うつ薬 SSRI の臨床効果に関する薬理遺伝学的研究～脳特異的 TPH2 の遺伝子多型の影響～

山下恵実, 福田剛史, 加藤正樹, 分野正貴, 福田和夫, 池永有香, 細井夕香, 奥川学, 延原健二, 木下利彦, 東純一

第26回日本臨床薬理学会年会, 2005年12月1日～3日(大分)

抗結核薬イソニアジドの薬物性肝障害と CYP2E1 遺伝子多型

中山哲, 大野雅子, 窪田竜二, 古塚深雪, 徳田愛理, 横田総一郎, 前倉亮二, 山本裕子, 東純一

医療薬学フォーラム 2005/第13回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2005年7月16日～17日(鹿児島)

ベッドサイドでの遺伝子型判定に向けて - NAT2 判定 DNA チップの有用性評価 -

古塚深雪, 大野雅子, 福田剛史, 窪田竜二, 中村奈緒子, 橋本幸二, 源間信弘, 東純一

医療薬学フォーラム 2005/第13回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2005年7月16日～17日(鹿児島)

Rapid acetylator (NAT2\*4/\*4) に対するイソ

ニアジド標準投与量の妥当性

中山哲, 大野雅子, 窪田竜二, 古塚深雪, 蓮沼智子, 飯島肇, 山田宏美, 武部雅人, 東純一

医療薬学フォーラム 2005/第13回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2005年7月16日～17日(鹿児島)

遺伝子多型情報に基づく SSRI 副作用回避

山下恵実, 福田剛史, 加藤正樹, 分野正貴, 福田和夫, 池永有香, 奥川学, 延原健二, 木下利彦, 東純一

The 12th Annual Meeting of Pacific Rim Association for Clinical Pharmacogenetics 2005 (PRACP2005), Apr 17-18, 2005 (Kyoto, Japan)

Lack of association between the beta adrenergic receptor polymorphisms and response to beta-blockers in Japanese chronic heart failure patients.

Nonen S, Okamoto H, Fujio Y, Kubota T, Fukuda T, Yoshiyama M, Takemoto Y, Yoshikawa J, Kitabatake A, Azuma J.

The 12th Annual Meeting of Pacific Rim Association for Clinical Pharmacogenetics 2005 (PRACP2005), Apr 17-18, 2005 (Kyoto, Japan)

Pharmacogenomic clinical trial for the selection of drug dosing or safety and effectiveness of isoniazid: NAT2 gene polymorphism and hepatotoxicity.

Azuma J, Ohno M, Kubota R, Furutsuka M, Nakayama S, Yokota S.



H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍---なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nonen S, Okamoto H, Akino M, Matsui Y, Fujio Y, Yoshiyama M, Takemoto Y, Yoshikawa J, Azuma J, Kitabatake A	No positive association between adrenergic receptor variants of $\alpha 2c$ Del322-325, $\alpha 1$ Ser49, $\alpha 1$ Arg389 and the risk for heart failure in Japanese population	British J Clin Pharmacol	60 (4)	414-417	2005
R Kubota, M Ohno, M Yasunaga, S Yokota, R Maekura, J Azuma.	Tentative treatments for tuberculosis based on N-acetyltransferase gene polymorphism.	Jpn J Therapeutic Drug Monitoring	22 (4)	336-340	2005

# No positive association between adrenergic receptor variants of $\alpha_{2c}$ Del322–325, $\beta_1$ Ser49, $\beta_1$ Arg389 and the risk for heart failure in the Japanese population

Shinpei Nonen, Hiroshi Okamoto,<sup>1</sup> Masatoshi Akino,<sup>1</sup> Yutaka Matsui,<sup>1</sup> Yasushi Fujio, Minoru Yoshiyama,<sup>2</sup> Yasuhiko Takemoto,<sup>2</sup> Junichi Yoshikawa,<sup>2</sup> Junichi Azuma & Akira Kitabatake<sup>1</sup>

Department of Clinical Evaluation of Medicines and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,

<sup>1</sup>Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, and <sup>2</sup>Department of Internal Medicine and Cardiology, Osaka City University School of Medicine, Osaka, Japan

## Correspondence

Junichi Azuma, Department of Clinical Evaluation of Medicines and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1–6 Yamada-oka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan.  
Tel: + 81 6 6879 8258  
Fax: + 81 6 6879 8259  
E-mail: azuma@phs.osaka-u.ac.jp

## Keywords

adrenergic receptor, chronic heart failure, Japanese, polymorphism

## Received

29 June 2004

## Accepted

7 April 2005

## Aims

We investigated the correlation of adrenergic receptor polymorphisms,  $\alpha_{2c}$ Del322–325,  $\beta_1$ Ser49Gly and  $\beta_1$ Arg389Gly, with the risk of heart failure in the Japanese population.

## Methods

These polymorphisms were analysed by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism in patients with chronic heart failure due to idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM) and compared with the control group.

## Results

There were no differences or any trends in the allele and genotype frequencies of the  $\beta_1$ Ser49Gly and  $\beta_1$ Arg389Gly polymorphisms. The allele frequency of the  $\alpha_{2c}$ Del322–325 variant was lower in patients than in controls (0.11 vs. 0.04,  $P = 0.011 < 0.017$ , by Bonferroni correction), while the genotype frequency just failed to reach significance ( $P = 0.022 > 0.017$ , by Bonferroni correction).

## Conclusions

In this population, the variants  $\beta_1$ Ser49,  $\beta_1$ Arg389, and  $\alpha_{2c}$ Del322–325 do not appear to be risk factors for chronic heart failure due to DCM. The  $\alpha_{2c}$ Del322–325 variant may in fact confer some protection.

## Introduction

Neurohumoral factors play important roles in cardiac remodelling, determining the prognosis of heart failure. In particular, the sympathetic nervous system is activated in patients with chronic heart failure (CHF) [1] and sustained stimulation of the adrenergic system exerts direct adverse effects on cardiac function [2]. In spite of the importance of the adrenergic system, the

effects of polymorphic mutation of adrenergic receptors on CHF remain to be fully elucidated.

In the present study, we focus on the presynaptic  $\alpha_{2c}$  adrenergic receptor (AR) polymorphism with the deletion of four consecutive amino acids,  $\alpha_{2c}$ Del322–325, and polymorphic amino acid variants of  $\beta_1$ AR, Ser49Gly and Arg389Gly. These polymorphic changes result in alteration of AR function. The presynaptic

$\alpha_2$ AR negatively regulates the release of norepinephrine from cardiac sympathetic nerves [3] and  $\alpha_{2c}$ Del322–325 polymorphism shows a 'loss-of-function' phenotype [4]. The postsynaptic  $\beta_1$ AR polymorphism,  $\beta_1$ Ser49Gly, affects receptor sensitivity and promotes the downregulation of the receptor to agonists *in vitro* [5]. The change of  $\beta_1$ AR from Arg to Gly at the 389 amino acid residue leads to the decrease in G-protein coupling [6]. Considering the importance of the adrenergic system as a modulator of cardiac remodelling, it could be proposed that polymorphisms of adrenergic receptor genes may be closely related to the risk of heart failure.

Recently, Small *et al.* proposed that the polymorphisms of  $\beta_1$ Arg389Gly and  $\alpha_{2c}$ Del322–325 are synergistically related to the risk of CHF in a black population [7]. However several concerns, including the aetiology of heart failure and the absence of analysis of  $\beta_1$ Ser49Gly frequency, have been raised against this study [8]. We have investigated the clinical significance of  $\alpha_{2c}$ Del322–325,  $\beta_1$ Ser49Gly, and  $\beta_1$ Arg389Gly for the risk of heart failure due to dilated cardiomyopathy (DCM) in the Japanese.

## Methods

### Subjects

The study subjects consisted of 91 unrelated consecutive patients with CHF due to idiopathic DCM (males 79.5%, age  $58.4 \pm 13.7$  years, ejection fraction  $34.6 \pm 15.8\%$ ) who attended or were admitted to Hokkaido University Hospital, Kyoto Katsura Hospital, Osaka Prefectural Medical Centre for Respiratory and Allergic Diseases, Aizenbashi Hospital or Osaka City

University Medical School Hospital. The ratio of the patients, classified as NYHA class I, II, III or IV, was 13.9, 46.8, 15.1, 24.1%, respectively. Patients with ischaemic cardiomyopathy were excluded. One hundred and nineteen subjects (all males, aged from 20 to 40 years) who had no history or symptoms of cardiovascular disease were chosen as controls. This study was approved by the institutional review committee. All subjects gave their informed consent to participate.

### Genotyping

Genomic DNA was extracted from samples of peripheral blood leucocytes using the QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen K.K., Tokyo, Japan) according to the manufacturer's protocol. Genotyping of  $\alpha_{2c}$ Del322–325,  $\beta_1$ Ser49Gly and  $\beta_1$ Arg389Gly polymorphisms was performed as described previously [4–6] with minor modifications.

### Statistical analysis

Values were expressed as means  $\pm$  SD.  $\chi^2$  test of independence was used to test for associations between heart failure and allele. The  $2 \times 3$  exact probability test was used to evaluate associations between heart failure and genotype. All of the analyses were corrected by Bonferroni correction.  $P < 0.017$  was considered to be significant. Statistical analysis was performed with StatView Version 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC, USA).

## Results

The allele and genotype frequencies of  $\alpha_{2c}$ Del322–325,  $\beta_1$ Ser49Gly and  $\beta_1$ Arg389Gly polymorphisms in the patients and controls are shown in Table 1. The allele

**Table 1**

Distribution of  $\alpha_{2c}$  and  $\beta_1$  adrenergic receptor (AR) variants in controls and patients with heart failure

Alleles and subjects	Allele		Genotype			P-value
	Frequency	P-value	WT/WT	WT/Del	Del/Del	
$\alpha_{2c}$ Del322–325						
Controls	0.11	0.011	95/119 (79.8%)	23/119 (19.3%)	1/119 (0.8%)	0.022
Patients with heart failure	0.04		84/91 (92.3%)	7/91 (7.7%)	0/91 (0%)	
$\beta_1$ Arg389						
Controls	0.81	0.82	5/119 (4.2%)	35/119 (29.4%)	79/119 (66.4%)	0.94
Patients with heart failure	0.80		5/91 (5.5%)	26/91 (28.6%)	60/91 (65.9%)	
$\beta_1$ Ser49						
Controls	0.84	0.90	3/119 (2.5%)	33/119 (27.7%)	83/119 (69.7%)	0.58
Patients with heart failure	0.84		4/91 (4.4%)	21/91 (23.1%)	66/91 (72.5%)	

P-values for comparisons of allele frequency or genotype frequency between controls and patients with heart failure were determined by  $2 \times 2 \chi^2$  or by  $2 \times 3$  exact probability test, respectively. P-value  $< 0.017$  (0.05/3) was considered to be significant.