

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

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連
遺伝子の多型探索及びそのテーラーメイド投薬への応用

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 齋藤 嘉朗

平成18（2006）年3月

目 次

I. 総括研究報告	
インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型探索及び そのテーラーメイド投薬への応用	----- 1
齋藤 嘉朗	
II. 分担研究報告	
1. インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型探索の ための臨床パネルの作成および新規候補遺伝子の探索	----- 11
安田 和基	
2. インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型解析	----- 17
齋藤 嘉朗	
3. インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型に関する 機能解析	----- 28
埴岡 伸光	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 39

I. 総括研究報告

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型探索
及びそのテーラーメイド投薬への応用

主任研究者 齋藤嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長

研究要旨： インスリン分泌促進型経口糖尿病薬、特にスルホニルウレア剤の薬効最適化とその持続・副作用低減化を目的として、患者毎の遺伝子型に基づく投薬法（二次無効発現の予測法を含む）を確立する。副作用及び一次無効との相関解析では、まず臨床パネルを作成し、これらの検体につき、薬効・薬物動態関連分子 *CYP2C9*, *CYP2C19*, *ABCC8*, *KCNJ11* の遺伝子多型の同定・ハプロタイプの推定を行った。さらに、これら4遺伝子計6ブロックのハプロタイプ群につき、相関解析を開始した。また本解析に利用するため、*CYP2C9* 及び *CYP2C19* で同定したアミノ酸置換を伴う新規遺伝子多型それぞれ7種及び2種につき、*in vitro* 機能解析を行い、うち4種および2種で機能低下・消失を確認した。一方、二次無効との相関解析では、まず二次無効群と対照群のゲノム解析用臨床パネルを作成した。二次無効群では糖尿病家族歴陽性率が高く、細小血管障害の発症率や増悪率が高い傾向にあった。これらの検体につき5種のインスリン分泌維持に重要と思われる遺伝子（*HNF4A*, *TNFAIP3*, *IPF1*, *HMOX1*, *GPX1*）の多型同定とハプロタイプの推定、並びに一部はタグ多型のタイピング系の開発を行った。さらに他の遺伝子の既知多型も含め、検体を用いた多型タイピングを、順次行った。またゲノム網羅的遺伝子多型解析も開始すると共に、新規候補遺伝子探索のため、二次無効を起こしやすい薬物と起こしにくい薬物により誘導が異なる遺伝子をDNAチップを用いて検索した。

分担研究者

国立国際医療センター研究所

代謝疾患研究部長

安田 和基

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科助教授 埴岡 伸光

また長期連用により薬効が消失する二次無効が約2割で発生し临床上問題となっている。これらには遺伝因子の関与も示唆されているが、相関する多型の報告は極めて少ない。

本研究はインスリン分泌促進型経口糖尿病薬、特にスルホニルウレア剤（以下、SU剤）の薬効最適化とその持続・副作用低減化を目的として、候補遺伝子及び網羅的遺伝子多型解析等を行い、患者毎の遺伝子型に基づく投薬法（二次無効発現の予測法を含む）を確立することを目的とする。

今年度は、副作用及び一次無効との相関

A. 研究目的

本邦の糖尿病患者は約1,000万人に達する。糖尿病は治癒することはなく、失明・腎症等の合併症を引き起こす。2型糖尿病の治療にはインスリン分泌促進型経口糖尿病薬が繁用されている。しかし、低血糖等の副作用や、2-3割で一次無効が起こり、

解析を目的として、インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の一種で第三世代の SU 剤であるグリメピリド投薬患者の臨床パネルを作成し、これらの検体（ゲノム DNA）につき、その薬物代謝を担う *CYP2C9* および *CYP2C19*、その受容体を形成する *ABCC8* (*SUR1*) および *KCNJ11* (*Kir6.2*) の遺伝子多型解析、及び *CYP2C9*・*CYP2C19* で新たに見いだされたアミノ酸置換を伴う新規多型、それぞれ 7 種及び 2 種の *in vitro* 機能解析を行った。また二次無効発現との相関解析を目的に、まず 85 例の臨床パネルを作成し、その臨床像に考察を加えた。同時に検体につき、膵臓細胞からのインスリン分泌の維持に重要と思われる遺伝子中、日本人の遺伝子多型情報が乏しい 5 遺伝子 (*HNF4A*, *TNFAIP3*, *IPF1*, *HMOX1*, *GPX1*) につき多型解析を終了し、順次、解析対象とするタグ多型を同定すると共に、これらタグ多型のタイピング系を一部開発した。さらに *IRSI* や *WFS1* の既知多型も含め、SU 剤の二次無効群および対象群の検体につき、多型タイピングを開始した。また、アフィメトリクス 500 K チップを用いたゲノム網羅的遺伝子多型解析も開始すると共に、新規候補遺伝子探索のため、二次無効を起こしやすい薬物と起こしにくい薬物により誘導が異なる遺伝子を DNA チップを用いて検索した。

B. 研究方法

1) 臨床パネルの作成

a) グリメピリド投与検体の臨床パネル（一次無効及び副作用解析用）

膵外作用を有し、今後使用頻度が高くなると予想される第三世代の SU 剤、グリメピリドを対象に選択した。HbA_{1c} 等の定量

値と相関解析をするため、厳密な群分けをせず解析に供した。

b) SU 剤二次無効との相関解析のための臨床パネル

SU 剤二次無効群と、対照群を設定し、ゲノム解析用のパネルを作成した。二次無効の厳密な定義は存在しないが、臨床的な視点から、A. 「一定期間 SU 剤を使用し」、かつ B. 「その後インスリン治療へ移行した」患者群を対象とした。A. については、SU 剤開始後早期にインスリン治療へ移行した者は、slowly progressive IDDM のように 1 型に近い病態、あるいは 2 型でも膵β細胞の進行性の減少が内因的に規定されている可能性があるため、これらを除外するため「3 年以上」とした。SU 剤であることが確認できれば、使用した SU 剤の種類については問わなかった。

一方対照群としては、C. 「一定期間以上 SU 剤を使用し」、かつ D. 「現在もインスリン治療へ移行していない」群を設定した。この C. については 5 年以上、とした。

2) シーケンシングによる遺伝子多型同定、連鎖不平衡解析、及びハプロタイプ解析

検体は、分担研究者である国立国際医療センター研究所・安田和基部長及び協力研究者である国立医薬品食品衛生研究所・頭金正博室長を通じて練馬総合病院より供頂いたもの（それぞれ計 158 及び 60 検体）の一部を解析した。

CYP2C9, *CYP2C19*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *HNF4A*, *TNFAIP3*, *IPF1*, *HMOX1*, *GPX1* のシーケンシングの概略は以下の通りである。対象領域はエクソン部分およびその近傍のイントロン部分、並びに既知のプロモーター領域及びエンハンサー領域とした。ゲノ

ム DNA を用いて、ミックスプライマー法 (*CYP2C9*, *CYP2C19*, *HNF4A*) またはロングレンジ PCR 法 (*ABCC8*, *HMOX1*, *TNFAIP3*, *GPX1*) にて増幅を行った。なお、エクソン数が少ない *IPF1* 及び *KCNJ11* については、1 段目の PCR 反応は行わなかった。第 2 段目の PCR 反応は各エクソン (領域) を増幅するために行った。PCR 産物を精製後、サイクルシーケンシング反応を行い配列を解析した。

連鎖不平衡解析では $|D'|$ 値および r^2 値で連鎖の強さを評価した。さらにハプロタイプ解析をソフトウェア LDSUPPORT (Kitamura Y. et al., *Ann. Hum. Genet.* 66: 183-193 (2002)) により行った。

3) タイピングによる検体の多型解析

TNFAIP3 については、ハプロタイプ解析結果に基づき、パイロシーケンシング法による簡便なタイピング系を開発し、二次無効との相関解析に利用した。即ち、コモンハプロタイプ 5 種及びアミノ酸置換を伴うハプロタイプ 3 種を検出するための 7 種のタグ多型を対象とした。まず各多型部位を含む断片をビオチン標識プライマーを用いてゲノム DNA より増幅した。PCR 産物をストレプトアビジンビーズに結合させ、アルカリ処理にて 1 本鎖化後、シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせた。これをミニシーケンシング反応して多型を解析した。なお、検体は SU 剤の二次無効患者群 24 名および対象患者群 60 名分を解析した。同タイピング系は、*IAPP* の Ser20Gly 多型についても開発・検体解析を行った。

また *IRS1* 及び *WFS1* の既知多型各 1 種につき、Taq-Man 法によるタイピングを添付のマニュアル通り行い解析した。

4) 新規候補遺伝子探索のための、膵 β 細胞における SU 剤による遺伝子発現変化解析

本年度は、二次無効を生じやすいグリベンクラミド、第 3 世代として期待されているグリメピリド、二次無効を生じにくいと想定されているレパグリニドについて実験を行った。

生理的な β 細胞に近いとされる、ラット INS-1D 細胞を用いて、 $0.1 \mu\text{M}$ グリベンクラミド、 $10 \mu\text{M}$ グリメピリド、 $1 \mu\text{M}$ レパグリニドを含む培地でそれぞれ 48 時間または 120 時間培養し、対照として 0.1% DMSO を加えた培地で培養した細胞と比較した。レパグリニドについては、8 時間ごとに培地交換を行う系もあわせて検討した。RNA を抽出し、GeneChip Rat Genome 2.0 Array (約 3 万転写産物、Affymetrix) を用いて遺伝子発現変化を解析した。

5) ゲノム網羅的遺伝子多型解析

二次無効との相関解析のため、Human Mapping 500K (*Nsp*, *Sty*) Array (Affymetrix) を用いたゲノム網羅的遺伝子多型解析を、添付のマニュアル通り、SU 剤の二次無効群および対象群のゲノム DNA につき開始した。

6) *CYP2C9* の新規遺伝子多型の機能解析

野生型及び 7 種の変異型 *CYP2C9* の発現プラスミドを調製後、COS-1 細胞にトランスフェクションし、そのマイクロソーム画分を調製した。また、別途、mRNA 定量のため全 RNA 画分を調製した。

mRNA レベルの定量は、逆転写後、TaqMan 法により行い、 β -actin mRNA レベルで補正した。蛋白質レベルの測定はイムノブロット法により行い、*CYP2C9* の発現量が既知のマイクロソーム画分と比較することにより定量した。酵素活性測定は *CYP2C9* の典型的基質であるジクロフ

ェナクの 4'-水酸化反応を測定し、速度論的解析を行った。

7) *CYP2C19* の新規遺伝子多型の機能解析

2 種の野生型及び 2 種の変異型 *CYP2C19* の発現プラスミド調製後、酵母細胞にトランスフェクションし、そのマイクロソーム画分を調製した。P450 発現レベルの測定は還元型 CO 差スペクトルにより行った。酵素活性測定は *CYP2C19* の典型的基質である *S*-メフェニトインの 4'-水酸化反応を測定し、速度論的解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は患者検体由来のヒトゲノム DNA を対象にし、遺伝子多型解析を行うと共に、臨床データを取り扱うものであり、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」及び「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、研究倫理審査委員会の承認のもとに行った。

C. 研究結果

1) 臨床パネルの作成

a) グリメピリド投与検体の臨床パネル(一次無効及び副作用解析用)

相関解析用に、134 例につき臨床パネルを作成し、ゲノム DNA と共に解析に供した。

b) SU 剤二次無効との相関解析のための臨床パネル

相関解析用に、二次無効群 25 名、対照群 60 名を収集した。このうち、ゲノム収量の少なかった二次無効群 1 例を除く合計 84 名について、臨床パネルを作成し、ゲノム DNA を調製した。また二次無効群と対照群について臨床情報を解析した。症例数が少なく、また背景因子を完全にそろえていな

いので、統計的な比較は難しいものの、BMI (Body mass index) あるいは既往最大 BMI は二次無効群で大きい傾向にあり、必ずしもやせ型が多いわけではなかった。発症年齢もほぼ同等であった。2 親等までの糖尿病家族歴陽性率は、二次無効群で高かった。罹病期間には両者で全く差がなかったが、糖尿病性神経症、網膜症及び前増殖性以上の網膜症、腎症はいずれも二次無効群で若干多い傾向にある。一方で、脳血管障害については、意外にも対照群で圧倒的に高率であった。

2) シーケンシングによる遺伝子多型同定、連鎖不平衡解析、及びハプロタイプ解析

各遺伝子での解析結果は以下の通りである。なお、コモンハプロタイプは、頻度 2-3%以上のものとした。

- a) *CYP2C9* : 32 種の新規を含む 62 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは新規の 7 種を含む 9 種類であった。1 ブロックとしてハプロタイプを解析し、46 種ハプロタイプを推定した。さらに 5 種類のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型 4 種を選定した。
- b) *CYP2C19* : 27 種の新規を含む 48 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは新規の 4 種を含む 7 種類であった。1 ブロックとしてハプロタイプを解析し、31 種ハプロタイプを推定した。さらに 5 種類のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型 5 種を選定した。
- c) *ABCC8* 及び *KCNJ11* : *ABCC8* では 55 種の新規を含む 111 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは新規の 6 種を含む 8 種類であった。*KCNJ11* では 11 種の新規を含む 21 多型を同定した。

このうちアミノ酸置換を伴うものは既知の2種類であった。これら2種の遺伝子は染色体上で近傍に位置しているため、一緒に連鎖不平衡解析を行い、4ブロックに分割後、ハプロタイプ解析を行った。ブロック1では30種類を、ブロック2で17種類を、ブロック3では36種類を、ブロック4 (*KCNJ11* を含むブロック) では34種類を、それぞれ推定した。さらにコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型も選定した。

- d) *HNF4A* : まずエクソン部分につき解析し、16種の新規を含む39多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは新規の2種を含む3種類であった。3ブロックに分割し、ハプロタイプ解析を行った。ブロック1では10種類を、ブロック2では16種類を、ブロック3では12種類を、それぞれ推定した。さらにコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型も選定した。
- e) *TNFAIP3*: 12種の新規を含む18多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは新規の3種を含む4種類であった。1ブロックとしてハプロタイプを解析し、13種のハプロタイプを推定した。さらに5種類のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型4種及びアミノ酸置換を伴うハプロタイプ3種を検出するためのタグ多型3種を選定した。
- f) *IPF1* : 6種の新規を含む10多型を同定した。1ブロックとしてハプロタイプを解析し、8種のハプロタイプを推定した。さらに4種類のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型3種を選定した。
- g) *HMOX1* : 9種の新規を含む15多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは既知の1種類であった。1ブロック

としてハプロタイプを解析し、19種のハプロタイプを推定した。さらに5種類のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型5種を選定した。

- h) *GPX1* : 4種の新規を含む9多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは既知の2種類であった。1ブロックとしてハプロタイプを解析し、7種のハプロタイプを推定した。さらに3種類のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型2種を選定した。

3) タイピングによる検体の多型解析

上記項で選定した *TNFAIP3* のタグ多型7種及び *IAPP* の既知多型1種につき、開発したタイピング系により解析し、全ての多型及び検体(84例)につき明瞭なタイピング結果が得られた。また *IRSI* の1多型及び *WFS1* の1多型につき、Taq-Man法によるタイピングを行い、解析した全ての多型及び検体(84例)につき明瞭なタイピング結果が得られた。

4) 新規候補遺伝子探索のための、膝β細胞におけるSU剤による遺伝子発現変化解析

- a) 各薬剤の48時間刺激による遺伝子変化
対照に比べて有意に変動していた遺伝子(転写産物)は、各薬剤で数十種認められたものの、十分再現性をもって変動している転写産物は少なく、また機能的にも一定の傾向は認められなかった。薬剤間で比較しても、共通して動いている遺伝子は予想外に少なく、各薬剤特異的な効果を反映しているのか、今後の検討が必要である。一方、レパグリニドを含む培地を頻りに交換した群では、発現上昇する遺伝子が多く、この中には小胞体ストレス応答に關与する遺伝子も含まれていた。

b) 各薬剤の 120 時間刺激による遺伝子変化
同様に 120 時間培養した系について解析し、各薬剤で数十種の遺伝子の発現量変化が認められたものの、機能的に一定の傾向は明らかでなかった。同一薬剤による 48 時間刺激と比較しても共通して変化している遺伝子は少なかった。ただし、興味深いことに、レパグリニドの頻回培地交換群で、通常刺激群より発現上昇している遺伝子は、48 時間、120 時間で共通しているものが多かった。その意義は不明であるが、発現変化が見られた遺伝子では機能のわかっているものも多かった。

5) ゲノム網羅的遺伝子多型解析

Nsp Array を用いて、まず日本人由来樹立細胞株の DNA につき解析し、アレル判定率が 90%程度以上になることを確認した後、検体を用いた解析を開始した。

6) *CYP2C9* の新規遺伝子多型の機能解析

空ベクター、野生型及び 7 種の変異型 (Leu17Ile, Lys118ArgfsX9, Thr130Arg, Arg150Leu, Gln214Leu, Pro279Thr, Ala477Thr) につき解析を行った。まずイムノブロットングにて蛋白発現レベルを解析した。Lys118ArgfsX9 では蛋白質が検出できなかったが、野生型及び他の 6 種の変異型では同程度の発現が認められた。一方、mRNA 発現レベルは野生型及び 7 種の変異型間で有意な差は認められなかった。最後にジクロフェナクの 4'-水酸化活性を測定したところ、まず Lys118ArgfsX9 では代謝物の生成が認められなかった。一方、他の 6 種の変異型の中では、野生型に比して、 K_m 値については Gln214Leu 及び Ala477Thr で有意な上昇が、P450 当たりの V_{max} 値では Thr130Arg で有意な低下が、それぞれ認め

られ、P450 当たりのクリアランス (V_{max}/K_m) 値についても Thr130Arg, Gln214Leu 及び Ala477Thr で有意な低下が認められた。一方、Leu17Ile, Arg150Leu 及び Pro279Thr における各パラメーター値は野生型と同様であった。

7) *CYP2C19* の新規遺伝子多型の機能解析

CYP2C19 の 2 種の新規遺伝子多型 (仮に *CYP2C19*X* 及び *CYP2C19*Y* と名付ける) の機能解析を行った。酵母細胞で発現した各 *CYP2C19* 蛋白質の、ミクロソーム画分における P450 含量は、野生型 (*CYP2C19.1A*, *CYP2C19.1B*) に比較して、*CYP2C19.X* では低下が、*CYP2C19.Y* では増加が認められた。*CYP2C19.X* 及び *CYP2C19.Y* の K_m 値は野生型のそれらより高かった。*CYP2C19.X* の P450 当たりの V_{max} 値は野生型とほぼ同程度であったが、*CYP2C19.Y* では野生型の 50%以下であった。また、*CYP2C19.X* 及び *CYP2C19.Y* の P450 当たりの *in vitro* クリアランス値はいずれも野生型より低かった。

8) グリメピリドの一次無効及び副作用と、ハプロタイプの相関解析

CYP2C9 と *CYP2C19* の機能解析結果を参考に、*CYP2C9*, *CYP2C19*, *ABCC8*, *KCNJ11* のハプロタイプ解析結果 (134 名分) と HbA_{1c} 値の変化や低血糖発現等の臨床情報との相関解析を、多変量解析手法を用いて開始した。

D. 考察

グリメピリドの一次無効及び副作用との相関を検討するための遺伝子多型解析は、解析が最終段階にある薬物トランスポーター *ABCC1* 等を含めて、ほぼ終了し、現在、相

関解析を行っている。

二次無効の解析では、二次無効群と対照群との患者臨床情報の比較において、患者の発症年齢や BMI は両群で差はないものの、糖尿病家族歴陽性率は二次無効群で高く、糖尿病関連の遺伝因子が二次無効発現に関与している可能性が示唆された。また、両群で罹病期間に差がないにもかかわらず、細小血管障害（神経障害、網膜症、腎症）の割合、及び進行した症例の割合は二次無効群で明らかに高く、これらは血糖コントロールが不良になりがちであった症例であることを示すと考えられ、二次無効群の管理の重要性、ひいては二次無効の早期予測の必要性が改めて示唆された。今後、パネルを拡大してさらに解析を進める予定である。

一方、二次無効との相関を検討するための遺伝子多型解析は、日本人における遺伝子多型情報が不足していた遺伝子群につきシーケンシング解析・ハプロタイプ解析を行い、5 遺伝子で終了・タグ多型の同定を行った。この他、*TCF1* 等についてもほぼ終了しており、順次、タイピング系の開発・検体解析を行う予定である。さらに HapMap プロジェクト等のデータを活用して、他の候補遺伝子の多型解析も行う。またこれら候補遺伝子の解析に加えて、GeneChip を用いたゲノム網羅的遺伝子多型解析も継続する。

二次無効に至る原因としては幾つか考えられているが、その中の一つとして SU 剤による膵β細胞の機能障害及び細胞死（アポトーシス）が挙げられる。そのメカニズムとしては、SU 剤による持続的なβ細胞の興奮が持続的な細胞内 Ca 濃度上昇をきたし、これがインスリン分泌抑制、さらにはβ細胞死を引き起こす、と推定されている。ま

た SU 剤による強制的な分泌刺激による小胞体ストレスや酸化ストレスの関与も想定されている。一方、SU 剤の中でも二次無効を起こし易いものと、起こしにくいものがあり、これらの薬剤による遺伝子発現変化の差を解析することにより、二次無効のメカニズムが解明され、新たな創薬標的となる可能性がある。今回の INS-1D 細胞における網羅的遺伝子発現解析ではまだ一定の傾向は得られておらず、インスリン分泌反応の減少など、表現型の変化を伴う濃度を各薬剤について検討した後、あらためて網羅的な発現解析を行う必要があると考えられる。

CYP2C9 の機能解析では、解析した 7 種の新規多型のうち 1 種で活性の消失が、また 3 種で活性の低下が認められた。活性が消失した Lys118ArgfsX9 は基質やヘムの結合領域を含む 75%を失うものであった。Km 値が上昇した Ala477Thr では基質との相互作用が変化した可能性が考えられた。また Vmax 値のみ変化した Thr130Arg では、酵素活性に必要な NADPH-P450 還元酵素やシクロム b5 との会合に影響を与えることにより酵素活性の低下を招いている可能性が考えられた。活性低下を伴う Ile359Leu を有する患者を含め、これら活性低下を示す多型を有している場合、グリメピドの効果が見られる傾向にあり、これらの多型による代謝能低下・薬物血中濃度上昇の可能性が考えられた。一方、*CYP2C19* の機能解析では、解析した 2 種の新規多型は共に酵素機能を低下させた。従って、これら 2 種のアミノ酸置換部位は S-メフェニトイン 4'-水酸化反応の触媒活性を規定する重要なアミノ酸残基であることが示唆された。なお、これら機能解析結果は、遺伝子多型と臨床情報との相関解析の際に利用する予定である。

今後は二次無効群および対象群の検体数を増やして臨床情報解析及び遺伝子多型解析を継続すると共に、候補遺伝子の多型解析では、網羅的発現解析で関与が示唆される遺伝子を含め、対象遺伝子数を大幅に増やす予定である。また、*HNF4A* 及び *TNFAIP-3* については、本年度の解析でアミノ酸置換を伴う新規遺伝子多型を見いだしたため、これらの *in vitro* 機能解析を行いたい。

E. 結論

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の有効性確保及び副作用回避のため、患者毎の遺伝子型に基づく投薬法を確立することを目指して研究を進めた。副作用及び一次無効との相関解析では、まず臨床パネルを作成し、検体につき、薬効・薬物動態関連分子群の遺伝子多型の同定・ハプロタイプの推定を行った。さらに、4 遺伝子計 6 ブロックのハプロタイプ群につき、相関解析を開始した。また本解析に利用するため、*CYP2C9* 及び *CYP2C19* で同定したアミノ酸置換を伴う新規遺伝子多型それぞれ 7 種及び 2 種につき、*in vitro* 機能解析を行い、うち 4 種および 2 種で機能低下・消失を確認した。一方、二次無効との相関解析では、二次無効群と対照群のゲノム解析用臨床パネルを作成した。二次無効群では糖尿病家族歴陽性率が高く、細小血管障害の発症率や増悪率が高い傾向にあった。これらの検体につき 5 種のインスリン分泌の維持に重要と思われる候補遺伝子の多型同定とハプロタイプの推定、並びに一部はタグ多型のタイピング系の開発を行った。さらに他の遺伝子の既知多型も含め、検体を用いた多型タイピングを、順次行った。またゲノム

網羅的遺伝子多型解析も開始すると共に、新規候補遺伝子探索のため、二次無効を起こしやすい薬物と起こしにくい薬物により誘導が異なる遺伝子を DNA チップを用いて検索した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, K. Maekawa, S. Ozawa, R. Hasegawa, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Suzuki, T. Yanagawa, M. Tohkin, and J. Sawada: Genetic variations and haplotypes of *CYP2C19* in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 20, 300-307, 2005.
- 2) S. Ikeda, K. Kurose, H. Jinno, K. Sai, S. Ozawa, R. Hasegawa, K. Komamura, T. Kotake, H. Morishita, S. Kamakura, M. Kitakaze, H. Tomoike, T. Tamura, N. Yamamoto, H. Kunitoh, Y. Yamada, Y. Ohe, Y. Shimada, K. Shirao, K. Kubota, H. Minami, A. Ohtsu, T. Yoshida, N. Saijo, Y. Saito and J. Sawada: Functional analysis of four naturally occurring variants of human constitutive androstane receptor. *Mol. Genet. Metab.*, 86, 314-319, 2005.
- 3) T. Isobe, H. Hichiya, N. Hanioka, S. Yamamoto, et al.: Different effects of desipramine on bufuralol 1"-hydroxylation by rat and human CYP2D enzymes. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 634-640, 2005.
- 4) S. Narimatsu, N. Takatsu, S. Yamano, Y. Inoue, N. Hanioka, et al.: The effect of

dimethyl sulfoxide on the function of cytochrome P450 2D6 in HepG2 cells upon the co-expression with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Chem. Biol. Interact.* 159, 47-57, 2006.

- 5) K. Sai, M. Itoda, Y. Saito, K. Kurose, N. Katori, N. Kaniwa, K. Komamura, T. Kotake, H. Morishita, H. Tomoike, S. Kamakura, M. Kitakaze, T. Tamura, N. Yamamoto, et al.: Genetic variations and haplotype structures of the *ABCB1* gene in a Japanese population: an expanded haplotype block covering the distal promoter region, and associated ethnic differences. *Ann. Hum. Genet.*, in press, 2006.
- 6) K. Maekawa, H. Fukushima-Uesaka, M. Tohkin, R. Hasegawa, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Suzuki, T. Yanagawa, Y. Saito and J. Sawada: Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of CYP2C9 in Japanese. *Pharmacogenet. Genomics*, in press, 2006.
- 7) H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, K. Maekawa, M. Saeki, N. Kamatani, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda and J. Sawada: Novel genetic variations and haplotypes of hepatocyte nuclear factor 4 α (*HNF4A*) found in Japanese type II diabetic patients. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, in press, 2006.

2. 学会発表

- 1) Saito, K., Dan, H., Masuda, K., Katsu T., Hanioka, N., Yamamoto, S., and Narimatsu, S.: The role of Glu-300 in stereoselective hexobarbital 3'-hydroxylation by cytochrome P450 2C19. 15th NA ISSX/20th JSSX Meeting, Maui, October, 2005.
- 2) 奥村佳史, 比知屋寛之, 埴岡伸光, 斎

藤嘉朗, 祖山晃子, 上野和行, 澤田純一, 成松鎮雄: 酵母発現 CYP2D6*10 酵素蛋白質のメキシレチン代謝能。第 44 回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、松山、2005 年 11 月。

- 3) 斎藤嘉朗、福島（上坂）浩美、前川京子、長谷川隆一、梶尾 裕、葛谷信明、安田和基、川本学、鎌谷直之、鈴木佳寿子、柳川達生、頭金正博、澤田純一：日本人における薬物代謝酵素 CYP2C19 の遺伝子多型探索及びハプロタイプ解析。日本薬学会第 126 年会、仙台、2006 年 3 月。
- 4) 前川京子、福島（上坂）浩美、頭金正博、長谷川隆一、梶尾 裕、葛谷信明、安田和基、川本学、鎌谷直之、鈴木佳寿子、柳川達生、斎藤嘉朗、澤田純一：日本人における薬物代謝酵素 CYP2C9 の遺伝子多型の探索及びハプロタイプ解析。日本薬学会第 126 年会、仙台、2006 年 3 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

II. 分担研究報告

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）
分担研究報告書

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型探索のための
臨床パネルの作成および新規候補遺伝子の探索

分担研究者 安田和基 国立国際医療センター研究所 代謝疾患研究部長

研究要旨

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬で繁用されているスルホニルウレア剤（SU 剤）の二次無効の遺伝子解析のために、まず「SU 剤二次無効群」と、「対照群」のゲノム解析用パネルを作成し、臨床像に若干の考察を加えた。「二次無効群」では家族歴陽性率がたかく、細小血管障害の発症率や増悪率が高い傾向にあった。次に「二次無効」の分子メカニズムを解析するために、「二次無効」を生じ易いとされる Glibenclamide、生じにくいとされる Repaglinide、第 3 世代の SU 剤として汎用されつつある Glimepiride のそれぞれを、INS-1D 細胞に 4 8 時間、1 2 0 時間作用させて、GeneChip システムで網羅的な遺伝子発現解析を行った。

A. 研究目的

スルホニルウレア剤（以下、SU 剤）の「二次無効」、すなわち治療効果を発揮した SU 剤が一定期間経過した後、臨床的に効かなくなり、インスリン治療へ移行する、という現象は、糖尿病の診療において頻繁にみられるばかりでなく、血糖コントロールの悪化や QOL の低下を招くなど、臨床的に最も重要な事象の 1 つである。しかしながら、その定義は一定でなく、その本体も膵β細胞の「疲弊」などと表現されることもあるが、分子メカニズムは明らかでない。

ここでは、「二次無効」の進展において、SU 剤自体が膵β細胞障害の進展に寄与するのではないか、という仮説を中心に注目し、そこに寄与する分子及び遺伝子の解明を目的とする。

B. 研究方法

(1) グリメピリド投与検体の臨床パネル（一次無効及び副作用解析用）

膵外作用を有し、今後使用頻度が高くなると予想される「第三世代」の SU 剤、Glimepiride を対象に選択し、74 例につき検体（ゲノム 10 μg）及び臨床情報（HbA_{1c} 値、空腹時血糖値等）を主任研究者齋藤嘉朗先生（国立医薬品食品衛生研究所）へ送付した。

(2) 「SU 剤二次無効」解析のための臨床パネル

「SU 剤二次無効群」と、「対照群」を設定し、ゲノム解析用のパネルを作成した。「二次無効」の厳密な定義は存在しないが、臨床的な視点から、A. 「一定期間 SU 剤を使用し」、かつ B. 「その後インスリン治療へ移行した」患者群を対象とした。A. については、SU 剤開始後早期にイ

ンスリン治療へ移行した者は、slowly progressive IDDM のように 1 型に近い病態、あるいは 2 型でも膵β細胞の進行性の減少が内因的に規定されている可能性があるため、これらを除外するため「3年以上」とした。SU 剤であることが確認できれば、使用した SU 剤の種類については、ここでは問わなかった。

一方対照群としては、C. 「一定期間以上 SU 剤を使用し」、かつ D. 「現在もインスリン治療へ移行していない」群を設定した。この C. については 5 年以上、とした。

(3) 膵β細胞における SU 剤による遺伝子発現変化

SU 剤は、膵β細胞に対して短期的には K-ATP チャンネルの閉鎖を通じて、インスリン分泌を促進するが、比較的長期に作用させた場合、β細胞の表現型にどのような変化をもたらすかについては、詳細は明らかでない。そこで、生理的なβ細胞に近いとされる、ラット INS-1D 細胞を用いて、以下の薬剤をそれぞれ 48hr、120hr 作用させた後、RNA を抽出し、Affymetrix 社、GeneChip Rat Genome 2.0 Array (約 3 万転写産物) を用いて遺伝子発現変化を解析した。

- **Glibenclamide** : SUR1 と Kir6.2 の両者に強力に結合し、K-ATP チャンネルの持続的な閉鎖を生じる。臨床的にも血糖降下作用は最も強力である一方、SU 剤二次無効を最もきたしやすいと考えられる。
- **Glimepiride** : いわゆる「第三世代」の SU 剤で、K-ATP チャンネル閉鎖以外に、インスリン抵抗性を改善する「膵外作用」が知られている。未知の標的タンパクの存在、PPAR γ 活性化作用が言われているが、詳細は明らかでない。

- **Gliclazide** : やはり Kir6.2 に結合して K-ATP チャンネルの閉鎖を生じるが、抗酸化作用を有することが知られている。
- **Tolbutamide** : 最も古典的な SU 剤の一つで、Kir6.2 に結合し、K-ATP チャンネルの閉鎖を生じるが、wash out されやすいなど作用の持続は glibenclamide より短い
- **Repaglinide, Nateglinide** : いわゆる速効型インスリン分泌促進剤で、アミノ酸誘導体で SU 剤とは異なる骨格をもつが、やはり K-ATP チャンネルに作用する。Repaglinide と Nateglinide は、臨床的には同類として扱うが、分子的には作用様式に差があると言われている。
- **Diazoxide** : SU 剤と逆に K-ATP チャンネルを開いて過分極を生じる薬剤である。糖尿病の臨床では用いないが、高グルコースによる毒性から膵β細胞を保護するという報告がみられる。

本年度は、このうち、まず、二次無効を生じやすい Glibenclamide、第 3 世代として期待されている Glimepiride、二次無効を生じにくいと想定されている Repaglinide について実験を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 13 年 4 月施行、平成 16 年 12 月全部改正、平成 17 年 6 月一部改正) 従い、当センター倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

(1) 「SU 剤二次無効」解析のための臨床パネル

① 遺伝子解析の同意を得た糖尿病患者 800 人のうち、まず 1 型糖尿病や他疾患による

2 次性糖尿病が否定され、薬剤内服履歴を確認することのできた約 200 人について、「A 及び B」「C 及び D」の者を抽出した。

・「A 及び B」を満たす者：25 名

・「C 及び D」を満たす者：60 名

このうち、ゲノム収量の少なかった二次無効群 1 例を除く合計 84 名分について、ゲノムワイド解析などに供するため、ゲノム 5 μ g を主任研究者斎藤嘉朗先生へ送っている。

② パネルの臨床背景

「A 及び B」(二次無効群)と「C 及び D」(対照群)について、糖尿病に関する臨床情報をまとめた(表 1)。症例数が少なくまた背景を完全にそろえていないので、統計的な比較はできないが、BMI (Body mass index) あるいは既往最大 BMI は「二次無効群」で大きい傾向にあり、必ずしもやせ型が多いわけではなかった。発症年齢もほぼ同等であった。2 親等までの糖尿病家族歴陽性率は、二次無効群で高かった(68% vs 55%)。罹病期間には両者で全く差がなかったが、糖尿病性神経症(52.0% vs 41.7%)、網膜症(60.0% vs 45.0%)及び前増殖性以上の網膜症(40.0% vs 26.7%)、腎症(36.0% vs 26.7%)はいずれも二次無効群で若干多い傾向にある。一方で、虚血性心疾患は 20.0% vs 15.0%、脳血管障害については、意外にも 4.0% vs 20.0%と対照群で圧倒的に多かった。

(2) 膵 β 細胞における SU 剤による遺伝子発現変化

① 各薬剤の 48hr 刺激による遺伝子変化

0.1 μ M Glibenclamide、10 μ M Glimepiride、1 μ M Repaglinide を含む RPMI 培地で INS-1D 細胞をそれぞれ 48hr 培養し、対照として 0.1%DMSO を加えた

培地で培養した細胞と比較した。Repaglinide については、8hr ごとに培地交換を行う系(以下 pulse)もあわせて検討した。

これらで、対照に比べて有意に変動していた遺伝子(転写産物)の数を表 2A に示す。このうち、n=2 で十分再現性をもって変動している転写産物は少なかった。Rat Genome アレイは、Human や Mouse のアレイに比べ、アノテーションの確定していない遺伝子産物や EST が多く、機能的にも一定の傾向はみられていない。

薬剤同士を比較しても、共通して動いている遺伝子は意外と少なく、これが実験系のばらつきによるのか、各薬剤特異的な効果を反映するのかについて、今後の検討が必要と思われる。

一方、Repaglinide を含む培地を頻りに培地交換(pulse)した群では、発現上昇する遺伝子が多く、その中には ER(小胞体)ストレス応答に関与する DDIT3 なども含まれていた。

② 各薬剤の 120hr 刺激による遺伝子

同様の薬剤で 120hr 培養した系について解析した(表 2B)。現在まだ n=1 の解析だが、やはり機能的な一定の傾向は明らかでなかった。同一実験でも 48hr 刺激と共通して動いている遺伝子は予想外に少なかった。

ただし、興味深いことに、Repaglinide の頻回投与で、通常投与より発現上昇している遺伝子は、48hr、120hr で共通しているものが多かった。その意義は不明であるが、機能のわかっている遺伝子も多く(Alas1、BIG-1、Kcnk3 など)、今後さらに検討して行きたい。

このほか、Tolbutamide、Gliclazide、

Diazoxide についても予備的実験を行っているが、詳しい解析は平成18年度におこなう予定である。

D. 考察

2 型糖尿病に遺伝因子が関与することは、家系解析、双生児研究を中心とした疫学的研究、あるいは最近のゲノム解析から、疑う余地はない。一方、SU 剤の二次無効に至る遺伝的背景があるかどうかについては、疫学的研究も含めてこれまで報告がない。しかしながら、必ずしもすべての患者で二次無効が生じるわけではなく、長期にわたって SU 剤が有効な症例も少なくないことから、二次無効に至る個人にはなんらかの背景が存在するのではないかと、というのが、糖尿病臨床医が抱く印象であった。

一般に、2 型糖尿病において、遺伝因子の関与がより大きいと想定される臨床像として、「家族歴濃厚」「発症年齢が低い」「肥満をとまなわれない」「インスリン治療へ進展している」などが挙げられる。従って「二次無効群」の方が、「家族歴がより濃厚で」「発症年齢がより低く」「BMI がより小さい」のではないかと予想された。

今回 SU 剤使用歴まで確認しえた約200 症例から、「二次無効群」と「対照群」を選択し、その臨床像を解析した。「二次無効群」は、発症年齢や BMI から見る限りは、単純に「糖尿病発症」の遺伝因子の濃い群とは言い切れない。一方、二次無効そのものの家族歴ではないものの、糖尿病家族歴陽性率は高く (68% vs 55%)、やはり糖尿病の遺伝因子のいくつかに関与している可能性もあると思われる。一方で、罹病期間に両群で差がなかったにもかかわらず、細小血管障害 (神経障害、網膜症、腎

症) の割合、及び進行した症例の割合は「二次無効群」で明らかに高く、これらは病的に二次無効と共通する可能性もあるが、むしろ血糖コントロールが不良になりがちであった症例であることを示すと考えられ、「二次無効群」の管理の重要性、ひいては二次無効の早期予測の必要性が、改めて示唆されたと考えられる。虚血性心疾患や脳血管障害のような動脈硬化性疾患の合併率は異なる傾向を示したが、血糖コントロール以外の要因も大きいとされているためかもしれない。遺伝子解析研究協力の同意を得たサンプルは、さらにこの倍ほどあるので、今後これらについて SU 剤使用歴を調査してパネルを拡大したい。

SU 剤が効かなくなる主な原因として、(1) 生活習慣の乱れ、(2) 他の疾患の合併や他の薬剤による糖尿病増悪、(3) 遺伝的背景によるインスリン分泌低下の進行、(4) 高血糖の持続による膵β細胞の「疲弊」、(5) SU 剤による膵β細胞の機能障害及び細胞死 (アポトーシス)、などが考えられる。このうち (3) (4) (5) は膵β細胞の経時的変化をとまなうものである。

臨床的に最も多いのは、(1) 及び (2) であり、また一時的にインスリンを併用して血糖を改善すると、SU 剤反応性が回復する例も多いことから、(4) の病態も注目されている。これに対し、(3) が考えられる病態としては、MODY (maturity onset diabetes of the young) に代表される、膵β細胞に関する強力な遺伝因子による糖尿病があり、抗 GAD 抗体陽性のいわゆる SPIDDM (あるいは、「1.5 型」糖尿病) が潜在することもある。これらは、病的には、むしろ「一次無効」に近いのかもしれないが、臨床的には「二次無効」の病像をとることがある。一方、病態として、依然

として議論があり、かつ臨床的に治療方針の選択の上で、重要なものは(5)である。その原因として、SU剤による持続的なβ細胞の興奮が持続的な細胞内Ca濃度上昇をきたし、これがインスリン分泌抑制、さらにはβ細胞死を引き起こす、という考え方が、最近注目されている。またSU剤による強制的な分泌刺激による小胞体(ER)ストレスや、酸化ストレスの関与も想定されている。しかし一方で、SU剤の中でも二次無効を起こし易いものと、起こしにくいものがあるとされ、特に作用が強力かつ持続時間の長いglibenclamideは二次無効を生じやすく、作用時間の短いrepaglinide、nateglinideあるいは抗酸化作用をもつgliclazideは比較的二次無効を生じにくいといわれる。

今回の実験で、各薬剤の濃度は過去の文献に用いられた濃度のうち、apoptosisをきたす濃度よりやや低目に設定した。実際、細胞数の明らかな減少は認めなかった。しかし、培地に含まれるFBS(仔ウシ血清)などから、薬物の真の濃度は不明であり、インスリン分泌反応の減少など、表現型の変化を伴う濃度を各薬剤について検討した後、あらためて網羅的な発現解析を行う必要があるとも考えられる。

E. 結論

「SU剤二次無効群」は「対照群」に比べて、必ずしもやせ型が多いわけではなかったが、家族歴陽性率が高く、また細小血管障害の発症例や増悪症例が多い傾向にあった。このパネルは、ゲノムワイドおよび候補遺伝子による解析に有用と考えられる。次に「二次無効」の分子メカニズムを解析するためのin vitroでの網羅的発現解析は

まだ解析途上であり、細胞の表現型変化との関連や、刺激方法の工夫等、詳細な検討が必要と思われ、今後さらに薬剤の種類をふやして比較検討してゆく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Saeki M, Kamatani N, Kajio H, Kuzuya N, Yasuda K, Sawada J. Novel genetic variations and haplotypes of hepatic nuclear factor 4 α (*HNF4 α*) found in Japanese type II diabetic patients. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, in press.

2) Maekawa K, Fukushima-Uesaka H, Tohkin M, Hasegawa R, Kajio H, Kuzuya N, Yasuda K, Kawaoto M, Kamatani N, Suzuki K, Yanagawa T, Saito Y, Sawada J. Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of *CYP2C9* in Japanese. *Pharmacogenet. Genomics*, in press.

3) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Ozawa S, Hasegawa R, Kajio H, Kuzuya N, Yasuda K, Kawamoto M, Kamatani N, Suzuki K, Yanagawa T, Tohkin M, Sawada J. Genetic variations and haplotypes of *CYP2C19* in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 20(4):300-7, 2005.

2. 学会発表

特になし

(予定を含む。)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表1 「二次無効群」と「対照群」の臨床像

	二次無効群	対照群
n	25	60
SU剤使用歴 (年)	8.8±3.02 (3~16年)	13.43±6.92 (5~35年)
年齢 (歳)	67.5±8.58	69.9±7.04
性別	男 19 女 6	男 41 女 19
罹病期間 (年)	21.9±6.29	21.5±8.08
HbA1c (%)	8.49±0.72	7.03±0.72
FBS (mg/dl)	179.64±42.12	144.71±22.08
BMI (kg/m ²)	24.0±2.26	23.2±2.65
Max BMI	27.4±3.24	26.8±3.28
家族歴あり*	17/25 (68.0%)	33/60 (55.0%)
神経症あり	13/25 (52.0%)	25/60 (41.7%)
網膜症あり	15/25 (60.0%)	27/60 (45.0%)
(福田A2以上)	10/25 (40.0%)	16/60 (26.7%)
腎症あり	9/25 (36.0%)	16/60 (26.7%)
(Cr 2 mg/dl 以上)	0/25 (0%)	1/60 (1.7%)
心疾患あり	5/25 (20.0%)	9/60 (15.0%)
脳血管障害あり	1/25 (4.0%)	12/60 (20.0%)

*2親等以内に糖尿病があるもの

表2. インスリン分泌刺激剤によりINS-1D細胞で発現変化した遺伝子数

	増加	減少
A. 48hr刺激		
Glibenclamide	12	83
Glimepiride	6	93
Repaglinide	6	58
Repaglinide (pulse)	86	24
B. 120hr刺激		
Glibenclamide	3	86
Glimepiride	6	61
Repaglinide	11	59
Repaglinide (pulse)	78	87

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）
分担研究報告書

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型解析

分担研究者 齋藤嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長

研究要旨： インスリン分泌促進型経口糖尿病薬、特にスルホニルウレア剤（SU 剤）の一次無効及び副作用との相関解析のため、薬効・薬物動態関連分子 *CYP2C9*, *CYP2C19*, *ABCC8*, *KCNJ11* の遺伝子多型を SU 剤投与患者等において同定し、さらにハプロタイプを推定した。これら 4 遺伝子計 6 ブロックのハプロタイプ群につき、相関解析を開始した。また本解析に利用するため、*CYP2C9* で同定したアミノ酸置換を伴う新規遺伝子多型 7 種につき、インビトロ機能解析を行い、うち 4 種で機能低下・消失を確認した。一方、SU 剤の二次無効との相関解析では、5 種のインスリン分泌維持に重要と思われる遺伝子 (*HNF4A*, *TNFAIP3*, *IPF1*, *HMOX1*, *GPX1*) の多型同定とハプロタイプの推定、並びに一部はタグ多型につきタイプピング系の開発を行った。さらに *IRS1* や *WFS1* の既知多型も含め、検体を用いた多型タイプピングを、順次行った。またゲノム網羅的遺伝子多型解析も開始した。

協力研究者

国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部

部長・澤田純一

主任研究官・前川京子

同・医薬安全科学部

室長・頭金正博

同・代謝生化学部

主任研究官・佐井君江

告は極めて少ない。

本研究はインスリン分泌促進型経口糖尿病薬、特にスルホニルウレア剤（以下、SU 剤）の薬効最適化とその持続・副作用低減化を目的として、候補遺伝子及び網羅的遺伝子多型解析等を行い、患者毎の遺伝子型に基づく投薬法（二次無効発現の予測法を含む）を確立することを目的とする。

今年度は、副作用及び一次無効との相関解析を目的として、SU 剤であるグリメピリドを投与された患者検体につき、その薬物代謝を担う *CYP2C9* および *CYP2C19*、並びにその受容体を形成する *ABCC8* (*SUR1*) および *KCNJ11* (*Kir6.2*) の遺伝子多型解析、及び *CYP2C9* で新たに見いだされたアミノ酸置換を伴う新規多型 7 種のインビトロ機能解析を行った。また二次無効発現との相関解析を目的に、膵臓細胞からのインスリン分泌の維持に重要と思われる遺伝子中、日本人の遺伝子多型情報が乏しい 5 遺伝子

A. 研究目的

本邦の糖尿病患者は約1,000万人に達する。糖尿病は治癒することなく、失明・腎症等の合併症を引き起こす。2型糖尿病の治療にはインスリン分泌促進型経口糖尿病薬が繁用されている。しかし、低血糖等の副作用や、2-3割で一次無効が起り、また長期連用により薬効が消失する二次無効が約2割で発生し臨床問題となっている。これらには遺伝因子の関与も示唆されているが、相関する多型の報