

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

薬効及び副作用発現の人種差に関わる
遺伝子多型に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 千葉 寛

平成18年（2006年）3月

目 次

I. 総括研究報告	
薬効及び副作用発現の人種差に関わる遺伝子多型に関する研究 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	5
2. トランスポーターの遺伝子多型と人種差 家入 一郎	8
3. 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	10
4. ヒト肝組織における SLC01B1 及び CYP3A mRNA 発現量の人種差 千葉 寛	20
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	30
IV. 研究成果の刊行物・別刷	32

別添 4

I 総括研究報告

総括研究報告書

薬効及び副作用発現の人種差に関わる遺伝子多型に関する研究

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

本研究の目的はでは日本人と白人種の肝組織パネルを用いた人種差の検討、薬物動態や薬効発現に関するフェノタイプが明らかな患者 DNA 試料を用いることにより、薬効や副作用発現に関わる遺伝子多型の人種差に関わる要因について明らかにしていくことである。平成17年度の研究成果は1) ワルファリン応答性の人種内および人種差に係る遺伝子多型を明らかにしたこと、2) OCT1408Met型患者では、メトホルミン肝取り込みに関与する発現量が低下し、メトホルミンの標的臓器の1つである肝への移行が減少することで効果が減弱する可能性を明らかにしたこと、3) *UGT1A4*に新規変異を10個見出すとともに、これらのSNP及び既知SNPの頻度の人種差が存在することを明らかにしたこと、4)日本人、白人種、ヒスパニック（メキシコ系アメリカ人）におけるCYP3A4及びSLCO1B1mRNA発現量の人種差を明らかにしたことである。

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
鳥取大学医学部付属病院薬剤部助教授

A. 研究目的

国外で得られた臨床試験の結果を国内で使用するためには医薬品の効果と安全性の人種による差異を考慮しなければならない。申請者らは平成16年度までの3年間、厚生労働科学研究班「薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究」を通じて、CYP3A4、CYP2C9、UDP-グルクロン酸転位酵素、SLCO1B1 (OATP-C)、BCRPなどの遺伝子について、遺伝子多型と薬物動態の人種差に関する基本的な情報を蓄積してきた。

本研究班では、日本人、黒人、白人種のゲノム試料に加え日本人と白人種の肝組織パネルを用いた人種差の検討、薬物動態や薬効発現に関するフェノタイプが明らかな患者DNA試料の検討など、多方面からの解析を加えることにより、薬物動態ばかりでなく、薬効及び副作用発現の人種差に関わる要因を明らかにしてい

くことを目的とする。具体的には、CYP2C9及びワルファリンの薬効発現関連遺伝子を越前が、グルクロン転位酵素分子種を鹿庭が、トランスポーター(BCRP,BSEP,OCT)の解析を家入が、CYP3A4等のCYPを中心とした薬物動態関連遺伝子を千葉が担当し、副作用及び薬効に人種差が生じる原因となる遺伝子多型を明らかにしていく。

B. 研究方法

ワルファリン感受性の人種差については、アジア人、白人、黒人データを統合しCYP2C9翻訳領域および5'上流領域の多型を検討した。ワルファリン投与量の個人間変動に対する寄与度は、3人種でワルファリンを抗凝固療法に服用していた患者から得られた試料の解析により行った。

UGTについては、日本人256人について、*UGT1A4*の5'上流域、エクソン1及びイントロン部分の遺伝子多型を調べ、主たる多型について、文献で報告されている日本人以外の結果と比較した。

トランスポーターについては遺伝子情報が不足していたため、日本人DNAを用いた多型解析を実施した。次に、臨床効果との関連評価で、メトホルミンに良好に反応した24名、反応が見られなかった糖尿病患者9名を対象として、効果に関与する要因の絞り込みを行った。さらに、要因として選択された遺

伝子変異の影響をヒト肝に発現する OCT1 mRNA 量で評価した。また、臨床効果との関連評価に先立ち、BSEP 遺伝子多型解析を日本人 DNA を用いて検討した。

CYP3A4 及び SLC01B1 については、日本人と白色人種及びヒスパニック（メキシコ系アメリカ人）の肝組織を用い、SLCO1B1 及び CYP3A mRNA 発現量をこれらの人種間で比較した。

C. 研究結果

1) ワルファリン感受性

3 人種において現時点で既知のかつ比較的頻度の高い CYP2C9 の変異アレルと他の変動要因である年齢、体重、ビタミン K エポキシド還元酵素(VKORC1)の遺伝多型(1173 C>T)のワルファリンの投与量に関する多変量解析を行った。その結果、CYP2C9 多型は全体として、VKORC1 の多型と同程度に重要であることが判明した。ただし、これらの機能分子変異の頻度は人種により異なり、白人は双方の変異を他の 2 人種よりも高頻度に保有しているためこれらの機能分子のジェノタイプングは白人で特にワルファリン投与量の個人差を事前に察知する上で意義があると考えられた。

2) UGT

計 19 箇所の変異が検出され、アミノ酸変異やフレームシフトを伴う新規の SNP も検出されたがいずれも頻度は低かった。欧米人において検出され、*in vitro* 実験で活性が変化すると報告されている P24T は、今回のサンプルからは検出されなかった。一方、同じく欧米人において検出され、*in vitro* 実験で活性が変化すると報告されている L48V は日本人においても検出され、そのアレル頻度は約 13%であった。この値はドイツ人における頻度とほぼ同程度であったが、フロリダ州のがん患者における頻度よりは高かった。なお、ドイツ人では P24T と L48V とは連鎖の程度が高いと報告されている。以上から、UGT1A4 の P24T と L48V の遺伝子多型の頻度には人種差があり、また、ハプロタイプにも人種差が存在すると考えられた。

3) トランスポーター

遺伝子解析の結果、OCT1 に 11 種類、OCT2 に 2 種類の変異を確認した。そのうち、5/11、2/2 が non-synonymous 変異でアミノ酸の置換を伴っていた。メトホルミンに対する responders (n=24) と non-responders (n=9) を判別する要因を検討した結果、年齢、BMI、

高脂血症治療の有無、408Met>Val (exon 7) が positive 要因、-43T>G (intron 1) が negative 要因として選択され、判別精度は 55.5%であった。そこで、ヒト肝を試料として、OCT1 mRNA 発現量を 408Met>Val 変異の有無で比較した結果、408Met で発現量の低下が観察された。一方、BSEP 遺伝子多型探索を行った結果、444Val>Ala を含むは 4 箇所のアミノ酸置換を伴う変異を同定し、このうち 3 箇所は頻度が低いものの新規変異であった。また、プロモーター領域にも比較的頻度の高い変異が存在し、ハプロタイプを形成していると思われる。現在、数名の服用患者の解析を実施中である。

4) CYP3A 及び SLC01B1

今回検討を行った 3 人種間においては、SLCO1B1 mRNA 発現量に大きな個人差が存在するものの、人種間には大きな差異は認められないことが明らかとなった。個人差の原因として-11187G>A の SLC01B1 mRNA 発現量に対する影響を比較したが、白人種日本人いずれにおいても SNP 保有者 (heterozygote) と非保有者 (wild type の homozygote) 間では、SLCO1B1 mRNA 発現量への有意な差は認められなかった。一方、CYP3A4 mRNA については、検討を行った 3 人種間で平均値に大きな差が認められ、白人種 > 日本人 > ヒスパニックの順で発現量の平均値が大きかった。これらの人種差には発現量の低い検体の割合が反映されている傾向が認められた。

D. 考察

1) ワルファリン感受性

これまでの研究から、ワルファリンの投与量の個人差には年齢、体重、人種が関係していることが指摘されている。今年度の成果からも、年齢、体重の両因子は 3 人種から得られたデータに基づいて検討しても独立して有意な変動因子であった。加齢とワルファリン投与量との負の相関は、CYP2C9 の遺伝背景とは独立した酵素発現量の低下であると想定される。また、体重と投与量との関与については、体重が肝臓組織重量と正の相関を有するためと推定された。これらの因子と比較して CYP2C9 および VKORC1 の遺伝多型は 30-40%前後より強い関与を有する因子であった。この結果は、ジェノタイプングが投与量の個人差を予測する上で demographic な因子より重要であることを示している。ただし、これらの機能分子変異の頻度は人種により異なり、白人は双方の変異を他の 2 人種よりも

高頻度に保有しているためこれらの機能分子のジェノタイプは白人で特にワルファリン投与量の個人差を事前に察知する上で意義があると考えられた。

2) UGT

P24T と L48V の頻度には明らかに人種差があると考えられる。UGT1A4 は、抗ヒスタミン剤やイミプラミンなどの抗うつ剤などのグルクロン酸抱合を担っているが、現在のところこれらの薬物に対する P24T と L48V の臨床的意義については明らかにされていないので、これらの変異の人種間差の意義については今後更に検討する必要がある。

3) トランスポーター

メトホルミン血糖降下作用には、以前より non-responders の存在が知られており、肝抵抗性を示すとの認識が臨床医にあったことから、本検討を着手した。41Phe>Leu, 117Pro>Leu, 160Phe>Leu, 341Pro>Leu, 408Met>Val の有無で層別したヒト肝を試料として、OCT1mRNA 発現量との関連を評価した。その結果、408Met を有する検体で、発現量の低下が見られた。患者データの解析結果では、408Met 型で効果の減少が示唆されており、この背景には、408Met 型患者では、メトホルミン肝取り込みに関与する OCT1 発現量が低下し、メトホルミンの標的臓器の 1 つである肝への移行が減少することで、効果が減弱することが想定された。一方、肺高血圧症を適応にする医薬品は少なく、新薬であるボセンタンが期待されている。しかし、本薬物の副作用として肝障害が知られている。ボセンタンが肝排泄されるためには、排出トランスポーターである BSEP が機能することが *in vitro* 実験で示唆されている。そこで、肝障害が胆汁排泄の遅延によるものと考え、本検討を着手した。BSEP の遺伝子多型探索から開始した。新規変異の同定とともに、haplotype の存在が示唆された。今後、臨床データの収集とその評価を実施する予定である。

4) CYP3A 及び SLCO1B1

今回の検討により、SLCO mRNA の発現にはその発現量を減少させる、または上昇させる複数の因子が存在し、そのために SLCO1B1 mRNA 発現量に大きな個人差を生じる可能性があることが明らかとなった。mRNA の発現量において個人差が生じる原因には、遺伝子多型、加齢、性差など様々な要因が考えられるが、これまでに SLCO1B1 において複数の遺伝子多型が存在することが

報告されており、*SLCO1B1* 遺伝子 5' 上流領域に SNP -11187G>A が存在することが報告されている。この SNP を含む *SLCO1B1* haplotype のひとつとして *17 が報告されており、この *17 の保有者では pravastatin の area under the plasma concentration curve が非保有者に比べ大きく上昇するとの報告がある。Pravastatin の体内動態には OATP1B1 が大きく寄与することが報告されていることから、SNP (-11187G>A) が OATP1B1 の機能や発現量に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

しかしながら、今回の結果は -11187G>A が *SLCO1B1* mRNA 発現量へ与える影響はほとんどないことを示しており、この SNP が mRNA 発現量の個人差の原因となっている可能性は少ないものと考えられた。

一方、CYP3A4mRNA については、白人種において CYP3A4mRNA 発現量の低い検体が全体の半分以上を占めており、平均値を下げる結果となっていた。実際、これら 3 人種間における CYP3A4mRNA 発現量の平均値はそれぞれ 1.8 ± 3.1 , 4.1 ± 2.9 , 7.1 ± 7.7 (normalized values by internal standard) であり、発現量の低い検体の割合が平均値の人種差に反映されているものと考えられた。今後 CYP3A4mRNA 発現量の低い検体はどのような要因を持つ検体であるかについて明らかにすることが人種差の原因解明につなが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通じて CYP2C9 基質薬物の応答性の個人差に関係する検討を行った。その結果、薬物動態関連の機能分子の応答性への関与は人種を問わず成立するが、その関与度は多型アレル存在頻度に依存して異なることも判明した。今後、薬物動態関連機能分子の多型研究成果の意義付けは人種差を考慮に入れてなされることにより、より意味のある成果が得られると期待される。

2) 日本人 256 人について、*UGT1A4* の 5' 上流域、エクソン 1 及びイントロン部分の遺伝子多型を調べたところ、合計 19 箇所の変異が検出され、アミノ酸変異やフレームシフトを伴う新規の SNP も検出されたがいずれも頻度は低かった。しかし、*in vitro* 実験で活性が変化すると報告されている L48V の頻度は約 13% と比較的高く、ドイツ人の頻度と

ほぼ等しかった。*UGT1A4* 遺伝子多型の人種差の意義についてはさらに検討を進める必要がある。

3) 糖尿病薬、肺高血圧症治療薬の効果や副作用に関連が予想される遺伝子の特定と多型の評価を実施した。人種差等の評価を加えていく予定である。

4) *SLCO1B1* mRNA 発現量には大きな個人差が存在するが人種間では発現量に大きな差異は存在しないことが示された。一方、*CYP3A4* mRNA については、検討を行った3人種間で平均値に大きな差が認められ、白人種>日本人>ヒスパニックの順で発現量の平均値が大きかった。これらの人種差には発現量の低い検体の割合が反映されている傾向が認められたことから、これらの検体がどのような要因によって発現量の低下が引き起こされているかを明らかにすることが人種差の解明につながる可能性が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA, Morita T, Ritchie MD, Scordo MG, Pengo V, Barban M, Padriani R, Ieiri I, Otsubo K, Kashima T, Kimura S, Kijima S, Echizen H. Different contributions of polymorphisms in *VKORC1* and *CYP2C9* to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. *Pharmacogenet Genomics*. 2006 16:101-110.

高橋晴美、Wilkinson GR、Nutescu EA、森田隆司、Scordo MG、Pengo V、Barban M、Padriani R、家入一郎、大坪健二、賀嶋俊隆、木村壮介、木島慎一、越前宏俊:日本人、白人、黒人患者のワルファリン投与量の個人差に及ぼす *VKORC1* と *CYP2C9* 多型の影響
日本血栓止血学会誌、16:549, 2005.

Ogawa R, Kishi R, Mihara K, Takahashi H, Takagi A, Matsumoto N, Masuhara K,

Nakazawa K, Miyake F, Kobayashi S, Echizen H. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of a class IC antiarrhythmic, pilsicainide, in patients with cardiac arrhythmias. *J Clin Pharmacol*. 46:59-68, 2006.

Ohnishi A, Murakami S, Akizuki S, Mochizuki J, Echizen H, Takagi I.

In vivo metabolic activity of *CYP2C19* and *CYP3A* in relation to *CYP2C19* genetic polymorphism in chronic liver disease. *J Clin Pharmacol*. 45:1221-9,2005

M. Saeki, Y. Saito, H. Jinno, K. Sai, A. Hachisuka, N. Kaniwa, S. Ozawa, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Shirao, H. Minami, A. Ohtsu, T. Yoshida, N. Saijo, K. Komamura, T. Kotake, H. Morishita, S. Kamakura, M. Kitakaze, H. Tomoike and J. Sawada: Genetic variations and haplotypes of *UGT1A4* in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 20, 144-151, 2005.

Ieiri I, Kimura M, Irie S, Urae A, Otsubo K, Ishizaki T. Interaction magnitude, pharmacokinetics and pharmacodynamics of ticlopidine in relation to *CYP2C19* genotypic status. *Pharmacogenet Genomics*. 15:851-9, 2005
Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K: Functional characterization of *SLCO1B1* (*OATP-C*) variants, *SLCO1B1**5, *SLCO1B1**15 and *SLCO1B1**15+*C1007G*, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenet Genomics*. 15:513-22, 2005.

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 5

II 分担研究報告

薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究 (14130301)

分担研究者 越前 宏俊 明治薬科大学 教授

研究要旨 医薬品の効果と副作用には遺伝的は素因が深く関係している。そのため、新規医薬品データを人種間で相互利用するためには、その薬物の体内動態と感受性に関係する機能分子に関わる人種差の検討が重要である。特に、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情報は近年長足の進歩を遂げている。本年度の分担研究において、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。人種間では変異アレル頻度には大きな差異があり、遺伝情報の CYP2C9 基質薬物の効果の個人差への意義付けは人種により大きくことなることが判明した。白人では CYP2C9 のジェノタイプングは効果と副作用の予測に有用であるが、アジア人と黒人においては副作用原因の解明に主とした意義があると考えられる。

A. 研究目的

新規医薬品データを人種間で相互利用するためには、その薬物の体内動態と感受性に関係する機能分子に関わる人種差の検討が重要である。特に、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情報は近年長足の進歩を遂げている。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情報が重要である。なかでもチトクローム P450(CYP)は多くの薬物の体内動態の個人差に関連するため、酵素の活性を左右する遺伝子多型の情報が有益となる。本研究では、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する事とした。

B. 研究方法

白人、黒人、アジア人サンプルに関して

は、協同入手した試料と国内で施設内倫理委員会の了承を受けた上で収集した試料を用いた。

今年度は、これまでの研究で明らかとなったアジア人、白人、黒人データを統合し CYP2C9 翻訳領域および 5' 上流領域の多型を検討した。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、Kidd's 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 Dr. Goldstein から好意にて提供された CYP2C9*6 試料を用いた。CYP2C9 の遺伝多型によるワルファリン投与量の個人間変動に対する寄与度は、3 人種でワルファリンを抗凝固療法に服用していた患者から得られた試料の解析により行った。

C. 研究結果

3 人種において現時点で既知のかつ比較的

頻度の高い変異アレルの検出により診断した野生型アレルの頻度は、黒人、白人、日本人（アジア）において、それぞれ 95.3%, 74.3%, 98.4%であった。また、CYP2C9*2 および CYP2C9*3 アレル頻度は、3人種でそれぞれ 0%, 14.3%, 0%および 0.8%, 10.9%, 1.6%であった。これらの薬物動態関連遺伝子変異の投与量の個人差に対する関与度は、他の変動要因である年齢、体重、ビタミン K エポキシド還元酵素(VKORC1)の遺伝多型(1173 C>T)とともに多変量解析を行った。その結果、CYP2C9多型は全体として、VKORC1の多型と同程度に重要であることが判明した。ただし、これらの機能分子変異の頻度は人種により異なり、白人は双方の変異を他の2人種よりも高頻度に保有しているためこれらの機能分子のジェノタイプピングは白人で特にワルファリン投与量の個人差を事前に察知する上で意義があると考えられた。

D. 考察

前年度までの検討により CYP2C9 の白人、黒人、アジア人の変異アレル種と頻度が明らかにされた。今年度は、これらの変異アレルの CYP2C9 基質薬物の代表であるワルファリンの投与量の個人間変動に対する意義付けを検討した。

これまでの研究から、ワルファリンの投与量の個人差には年齢、体重、人種が関係していることが指摘されている。今年度の成果からも、年齢、体重の両因子は3人種から得られたデータに基づいて検討しても独立して有意な変動因子であった。加齢とワルファリン投与量との負の相関は、CYP2C9の遺伝背景とは独立した酵素発現量の低下であると想定される。また、体重と投与量との関与については、体重が肝臓組織重量と正の相関を有するためと推定された。これらの因子と比較して CYP2C9 および VKORC1 の遺伝多型は 30-40% 前後より強い関与を有する因子であった。この結果は、ジェノタイプピングが投与量の個人

差を予測する上で demographic な因子より重要であることを示している。ただし、これらの機能分子変異の頻度は人種により異なり、白人は双方の変異を他の2人種よりも高頻度に保有しているためこれらの機能分子のジェノタイプピングは白人で特にワルファリン投与量の個人差を事前に察知する上で意義があると考えられた。

E. 結論

白人、黒人、アジア（日本）人の3人種における CYP2C9 遺伝子の多型検索を通じて CYP2C9 基質薬物の応答性の個人差に関する検討を行った。その結果、薬物動態関連の機能分子の応答性への関与は人種を問わず成立するが、その関与度は多型アレル存在頻度に依存して異なることも判明した。今後、薬物動態関連機能分子の多型研究成果の意義付けは人種差を考慮に入れてなされることにより、より意味のある成果が得られると期待される。

F. 健康被害状況

解析対象となる血液試料の収集は初年度で終了しており、以後に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, Nutescu EA, Morita T, Ritchie MD, Scordo MG, Pengo V, Barban M, Padrini R, Ieiri I, Otsubo K, Kashima T, Kimura S, Kijima S, Echizen H. Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. *Pharmacogenet Genomics*. 2006 16:101-110.

高橋晴美、Wilkinson GR、Nutescu EA、森田隆司、Scordo MG、Pengo V、Barban M、Padrini R、家入一郎、大坪健二、賀嶋俊隆、木村壮介、木島慎一、越前宏俊:日本人、白人、黒人患者のワルファリン投与量の個人差に

及ぼす VKORC1 と CYP2C9 多型の影響

日本血栓止血学会誌、16:549, 2005.

2.学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度の成果についてはありません。

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

薬効及び副作用発現の人種差に関わる遺伝子多型に関する研究
分担研究者 家入 一郎 九州大学大学院薬学研究院薬物動態学分野・助教授

研究要旨: 本年度は以下について重点的に検討した;(1) OCT1, OCT2遺伝子多型と糖尿病治療薬メトホルミンの治療効果との関連評価、(2) BSEP遺伝子多型探索。メトホルミンには一定の割合でノンレスポnderが存在することから、作用部位である肝輸送に関与するOCTsとの関連を多型から評価した。OCT1,2の多型探索から開始したが、同定した変異の中で408Met>Val (1222A>G) の関与を強く認め、A型で効果が減弱する結果となった。ヒト肝でのmRNA発現量はA型で低下することから、変異保有患者ではメトホルミンの肝への取り込みが低下し、効果が減弱するものと考えられた。(2) ポセンタンは肺高血圧症治療薬として世界で初めて認可された経口エンドセリン受容体拮抗薬であり、患者数はすくないものの、治療効果が期待される数少ない治療薬である。しかし、肝障害が報告されている。本検討では、肝輸送に関与するBSEP遺伝子変異の関与を疑い検討を開始した。多型探索の結果、444Val>Alaを含む4箇所のアミノ酸置換を伴う変異を同定し、このうち3箇所は頻度が低いものの新規変異であった。また、プロモーター領域にも比較的頻度の高い変異が存在し、ハプロタイプを形成していると思われる。現在、数名の服用患者の解析を実施中である。

A. 研究目的

薬物トランスポーター遺伝子多型と基質薬物の臨床効果、副作用との関連を評価することで、大きな個人差の原因を解明すると同時に、原因遺伝子多型の人種差を明らかにすることで、医薬品開発、適正使用に有益な情報の提供を目指す。

B. 研究方法

(1) OCT1, OCT2遺伝子多型とメトホルミン血糖降下作用との関連評価; 遺伝子情報が不足していたため、日本人DNAを用いた多型解析を実施した。次に、臨床効果との関連評価で、メトホルミンに良好に反応した24名、反応が見られなかった糖尿病患者9名を対象として、効果に関与する要因の絞り込みを行った。さらに、要因として選択された遺伝子変異の影響をヒト肝に発現するOCT1mRNA量で評価した。(2) 臨床効果との関連評価に先立ち、BSEP遺伝子多型解析を日本人DNAを用いて検討した。(倫理面への配慮); 遺伝子解析に使用したDNAは連結不可能匿名化された試料であり、本研究の目的等、倫理指針に準拠した説明を行い、書面による承諾を得た後に使用した。さらに、総ての研究は鳥取大学医学部倫理審査委員会、審査・承認を受けた後実施した。

B. 研究結果

(1) OCT1, OCT2遺伝子多型と糖尿病治療薬メトホルミンの治療効果との関連評価; 遺伝子解析の結果、OCT1に11種類、OCT2に2種類の変異を確認した。そのうち、5/11、2/2がnon-synonymous変異でアミノ酸の置換を伴っていた。メトホルミンに対するresponders (n=24)とnon-responders (n=9)を判別する要因を検討した結果、年齢、BMI、高脂血症治療の有無、408Met>Val (exon 7)がpositive要因、-43T>G (intron 1)がnegative要因として選択され、判別精度は55.5%であった。そこで、ヒト肝を試料として、OCT1mRNA発現量を408Met>Val変異の有無で比較した結果、408Metで発現量の低下が観察された。(2) BSEP遺伝子多型探索; 多型探索の結果、444Val>Alaを含む4箇所のアミノ酸置換を伴う変異を同定し、このうち3箇所は頻度が低いものの新規変異であった。また、プロモーター領域にも比較的頻度の高い変異が存在し、ハプロタイプを形成していると思われる。現在、数名の服用患者の解析を実施中である。

D. 考察

今回の検討では、人種差の検討は行わず、日本人での薬効に関与する遺伝子変異の選定を重点的に実施した。メトホルミン血糖降下作用には、以前よりnon-respondersの存在が知られており、肝抵抗性を示すとの認識が臨床医にあったことから、本検討を着手した。41Phe>Leu, 117Pro>Leu, 160Phe>Leu, 341Pro>Leu, 408Met>Valの有無で層別したヒト肝を試料として、OCT1mRNA発現量との関連を評価した。その結果、408Metを有することで、発現量の低下が見られた。患者データの解析結果では、408Met型で効果の減少が示唆されており、この背景には、408Met型患者では、メトホルミン肝取り込みに関与するOCT1発現量が低下し、メトホルミンの標的臓器の1つである肝への移行が減少することで、効果が減弱することが想定された。(2) 肺高血圧症に適応する医薬品は少なく、新薬であるポセンタンが期待されている。しかし、本薬物の副作用として肝障害が知られている。ポセンタンが肝排泄されるためには、排出トランスポーターであるBSEPが機能することがin vitro実験で示唆されている。そこで、肝障害が胆汁排泄の遅延によるものと考え、本検討を着手した。BSEPの遺伝子多型探索から開始した。新規変異の同定とともに、haplotypeの存在が示唆された。今後、臨床データの収集とその評価を実施する予定である。

E. 結論

糖尿病薬、肺高血圧症治療薬の効果や副作用に関連が予想される遺伝子の特定と多型の評価を実施した。人種差等の評価を加えていく予定である。

F. 健康危険情報

特にないが、疾患や医薬品効果の個人差解明に関する知見が得られた。

G. 研究発表(紙上発表)

別紙一覧を参照。

(学会発表)

別紙一覧を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在までに出願、登録はない。

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
論文(紙上)発表					
家入一郎	薬物トランスポーターと薬剤感受性(1)-薬物トランスポーター遺伝子多型の臨床的意義-	最新医学	60	1827-1832	2005
Ieiri I et al.	Interaction magnitude, pharmacokinetics and pharmacodynamics of ticlopidine in relation to CYP2C19 genotypic status	Pharmacogenet Genomics	15	851-859	2005
学会発表					
	タイトル名	学会名	開催地	年	
Ieiri I	Multiple gene polymorphisms	Asian symposium for pharmaceutical Science in JSPS	Fukuoka	2006	
Ieiri I	Interactive session - Warfarin pharmacogenomics	The first FIP-APSTJ joint workshop on individualized medicine	Tokyo	2006	

薬効及び副作用発現の人種差に関わる遺伝子多型に関する研究

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 抗ヒスタミン剤やイミプラミンなどの抗うつ剤やアンドロゲン類などのグルクロン酸抱合を担っている UGT1A4 の遺伝子多型の人種間差を調べるために、日本人 256 人について、UGT1A4 の 5' 上流域、エクソン 1 及びイントロン部分の遺伝子多型を調べ、主たる多型について、文献で報告されている日本人以外の結果と比較した。

合計 19 箇所の変異が検出され、アミノ酸変異やフレームシフトを伴う新規の SNP も検出されたがいずれも頻度は低かった。欧米人において検出され、*in vitro* 実験で活性が変化すると報告されている P24T は、今回のサンプルからは検出されなかった。一方、同じく欧米人において検出され、*in vitro* 実験で活性が変化すると報告されている L48V は日本人においても検出され、そのアレル頻度は約 13% であった。この値はドイツ人における頻度とほぼ同程度であったが、フロリダ州のがん患者における頻度よりは高かった。なお、ドイツ人では P24T と L48V とは連鎖の程度が高いと報告されている。以上から、UGT1A4 の P24T と L48V の遺伝子多型の頻度には人種差があり、また、ハプロタイプにも人種差があると考えられた。

UGT1A4 の遺伝子多型における人種差の臨床的意義については、今後更に検討する必要がある。

A. 研究目的

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いる。そのため、医薬品開発のグローバル化が急速に進んでいる現在にあっても、新医薬品の承認審査において、国外で得られた臨床試験結果を、そのまま日本人における医薬品の有効性と安全性の根拠とすることはできない。ICH では、ある人種で得られた結果を他の人種に外挿するための *bridging study* を義務づけている。薬物の体内動態の人種差の要因にひとつに、代謝酵素やトランスポーターをコードする遺伝子における多型の種類と頻度の人種差

が上げられる。筆者は、平成 16 年度までの 3 年間で、厚生労働科学研究班「薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究」班の中で、グルクロン酸抱合に係わる UGT1A1 の遺伝子多型の人種差について検討し、グルクロン酸抱合により解毒化される薬物の人種間ブリッジングに際しては、UGT1A1*28 の他に UGT1A1*6 についても考慮しなければならないことを明らかにしてきた。

本年度より始まった「薬効及び副作用発現の人種差に関わる遺伝子多型に関する研究」においては、筆者は、UGT1A1 以外の

グルクロニル転位酵素の分子種の遺伝子多型の種類と頻度を明らかにすると共に、肝組織を用いて、遺伝子多型の及ぼす影響について検討し、グルクロニル転位酵素の遺伝子多型が原因で生じる人種差について詳細に検討する予定である。

今年度は、ヒト肝組織の入手先の検討及び研究倫理申請の手続きを行った。また、*UGT1A4*の遺伝子多型の人種差を明らかにする目的で、日本人における*UGT1A4*の遺伝子多型の頻度を検討した。*UGT1A4*は、肝臓、胆管、小腸、大腸、膵臓に発現し、13) ニコチンやイミプラミンなどの外因性アミン類、アンドロゲン類やプロゲステロン類などの内因性物質のグルクロン酸抱合を担っている。1,47)

B. 研究方法

(1) 試料

書面にて同意が得られた日本人のがん患者 88 人及び不整脈患者 108 人より得た末梢血より採取した DNA、並びに、同じく書面にて同意が得られた健康志願者 60 人より得た Epstein-Barr ウィルス形質転換リンパ芽球細胞より採取した DNA を用いた。

(2) 遺伝子のタイピング

*UGT1A*に属する分子種は 13 個の固有のエクソン 1 を有し (そのうち 4 個は偽遺伝子である)、エクソン 2~5 は全分子種間で共有されている。平成 16 年度までの厚生労働科学研究班「薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究」班において、エクソン 2~5 の主たる遺伝子多型については、既に、日本人、白人、黒人の 3 人種間における差を明らかにしてきた。そこで、今回は

*UGT1A4*のエクソン 1 を中心に検討を行った。

1) 100 ng の DNA を、Table 1 に示した増幅用プライマー・セット 0.2 μ M、*Ex-Taq* (タカラバイオ株式会社、大津) 0.625 U を用いて、以下の PCR 条件で増幅させた。

94°C (5 min)	} 30 cycles
94°C (30 sec)	
55°C (1 min)	
72°C (2 min)	
72°C (7 min)	

PCR 産物を、PCR Product Pre-Sequencing Kit (USB Co., Cleveland, OH, USA) で処理し、両鎖を Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて、シーケンシングした。シーケンシング用プライマーは Table 1 に示した。測定は ABI Prism 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) で行った。

(4) 連鎖不平衡解析及びハプロタイプ解析

Hardy-Weinberg 平衡解析及び連鎖不平衡解析は SNPalyze ソフトウェア (Dynacom Co., 横浜) で行った。全ての座位がホモ接合の SNP の組み合わせ、又は、1 箇所のみがヘテロ接合の SNP を有する被験者から一義的に決まるハプロタイプを除いては、LDSUPPORT ソフトウェア⁸⁾ を用いて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

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づいて実施された。患者の試料は連結可能匿名化された試料で、

対応表は外部の機関にあったので個人情報
が本研究から遺漏する恐れはなかった。健
康志願者については、連結不可能匿名化さ
れた試料である。本研究は、国立衛研の倫
理委員会が承認した範囲で行われた。

C. 研究結果

(1) 検出された遺伝子多型

Table 2 に、256 人の被験者から検出され
た 19 箇所の多型を示した。いずれの変異も、
Hardy-Weinberg 平衡解析が成立していた。
11 箇所の変異 (5'上流域から 2 箇所、エク
ソン部分で 6 箇所、及び、イントロンで 3
箇所) は新規多型であった。エクソン部分
の新規多型のうち、2 箇所の SNP、
SNP271C>T (R91C) 及び 325A>G
(R109G) はアミノ酸変異及びを伴い、2
箇所の SNP、127delA (43fsX22) 及び
175delG (59fsX6) はフレームシフトを生
じる結果ストップコドンが発生する変異で
あったが、いずれも頻度は非常に低かった。
また、同じく頻度は低いが、エクソン 1 に
続くイントロンのスプライス・ドナー部分
の SNP (IVS1+1G>T) も検出された。な
お、ドイツ人又はフロリダ州のがん患者で
検出されている SNP、⁹⁻¹⁰⁾ 70C>A (P24T)
は、今回検出されなかった。アミノ酸変異
を伴う既知の SNP、R11W 及び L48V は検
出され、それぞれ頻度は 0.012 と 0.129 で
あった。

(2) ハプロタイプ解析

検出された 19 個の遺伝子変異を用いて
ハプロタイプ解析を行った。1 名の被験者
を除いて 255 名の被験者では、0.9998 以上
の確度でディプロタイプを推定することが

できた。決定又は推定されたハプロタイプ
を Table 3 に示した。最もメジャーなハプ
ロタイプは*1a で頻度は 0.818、次に頻度の
高いハプロタイプは L48V を有する*3a で、
頻度は 0.123 であった。

D. 考察

今回、アミノ酸変異あるいはフレームシ
フトを伴う新規 SNP が検出された。フレー
ムシフトを伴う SNP を有する遺伝子から
は、おそらく活性のある酵素は生成されな
いと予測できるが、アミノ酸変異を伴う
SNP から生成する酵素の機能変化につい
ては不明である。しかし、いずれも頻度が非
常に低いために、日本人における UGT1A4
によるグルクロン酸抱合の変動の原因とな
るとは考えられなかった。

Mori らは、日本人 100 人について
UGT1A4 のエクソン 1 とイントロンの遺伝
子多型を調べた。¹¹⁾ それによれば、L48V、
L150L、P268P 及び IVS 1+43 が検出され、
それらの頻度は今回の筆者らが報告した頻
度よりも少し高めであった (Table 2)。ま
た、Mori らも、日本人においては、P24T
は検出されなかったと報告している。Mori
らは、検出した 4 個の SNP を用いてハプロ
タイプ解析を行ったが、筆者らの*1a に相
当するハプロタイプの頻度は 0.825、*3a 及
び*3b に相当するハプロタイプの頻度はそ
れぞれ 0.155 と 0.01、*1c に相当するハプ
ロタイプの頻度は 0.01 と報告しており、こ
れらは Table 3 に示す筆者らの報告に匹敵
している。このことより、UGT1A4 の日本
人におけるメジャーなハプロタイプは*1a
で (頻度 80%強)、残る比較的メジャーなハ
プロタイプは*3a で頻度は 12~15%程度で

あり、*1グループと*3グループの2つのハプロタイプのグループに日本人の約98%が含まれると推定できた。

UGT1A4では、アミノ酸変異を伴うSNPとしては、R11W、P24T及びL48Wの存在が報告されてきた(dbSNP-NCBI database、Table 2)。R11Wに関しては、本研究で観測された日本人における頻度は1%程度で、それ程高くはなかった。日本人以外の人種における頻度については報告がないが、恐らくそれ程高くはないと思われる。本研究及びMoriらの研究で、日本人では検出されなかったP24Tは、ドイツ人及びフロリダ州のがん患者ではアリル頻度は約8%程度と報告されている。⁹⁻¹⁰⁾一方、L48Vは、ドイツ人の頻度は9.5%と報告されており、⁹⁾今回観測された頻度12.9%(95%信頼区間0.100~0.158)とほぼ匹敵している。しかし、フロリダ州のがん患者のL48Vの頻度は2.6%と報告されており、¹⁰⁾ドイツ人及び日本人よりはかなり頻度が低い。また、ドイツ人ではP24TとL48Vには強度の連鎖が観察された。⁹⁾以上より、P24TとL48Vの発現頻度、及び、UGT1A4のハプロタイプには、人種差が存在すると結論づけられる。

現在までのところ、R11Wに関しては、機能変化の報告はない。P24T及びL48Vの機能変化に関する、Ehmerら、Wienerら、及び、Moriらの結果をTable 4に示した。Ehmerらによれば、UGT1A4をHEK293株に発現させた実験系では、野生型に比較し、 β -ナフチルアミン、trans-アンドロステロン、ジヒドロテストステロンに対する活性は低下し、ベンチジンに対しては活性が検出できなかった。⁹⁾一方、Wienerらは、

ヒト肝ミクロゾームを用いた4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-but anone (NNAL)のグルクロン酸抱合活性では、24Tの変異を有する場合は24P/24Pに比較して有意に活性が上昇したと異なる報告をしている。¹⁰⁾UGT1A4をCOS-7株に発現させたMoriらの実験系では、tigogeninを除いては、L48Vも野生型に比較して活性が上昇すると報告している。¹¹⁾このように、これら2つのSNPの機能変化に関しては、研究者間で結果に不一致が見られるが、基質の違いによるものか、あるいは、実験系の違いによるものなのかは、今後の検討を待たなければならない。

筆者らは、今後、日本人の肝組織を用いてUGT1Asの遺伝子多型と活性との関連を明らかにしようとしている。その中で、UGT1A4のL48Vの活性も明らかになる可能性がある。

E. 結論

日本人256人について、UGT1A4の5'上流域、エクソン1及びイントロン部分の遺伝子多型を調べた。合計19箇所の変異が検出され、アミノ酸変異やフレームシフトを伴う新規のSNPも検出されたがいずれも頻度は低かった。in vitro実験で活性が変化すると報告されているP24TとL48Vのうち、前者は検出されなかった。L48Vの頻度は約13%で、この値はドイツ人における頻度とほぼ同程度であったが、フロリダ州のがん患者における頻度よりは高かった。明らかにこれらのSNPには人種差があると考えられる。

UGT1A4は、抗ヒスタミン剤やイミプラミンなどの抗うつ剤などのグルクロン酸抱

合を担っているが、現在のところこれらの薬物に対する P24T と L48V の臨床的意義については明らかにされていないので、これらの変異の人種間差の重要性については、今後更に検討する必要がある。

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、斎藤嘉朗博士、及び佐伯真弓研究員に深謝致します。

参考文献

- 1) Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:581-616.
- 2) Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics.* 1997;7(4):255-69.
- 3) Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH, Manns MP. Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem.* 2000;275(46):36164-71.
- 4) Green MD, Tephly TR. Glucuronidation of amines and

hydroxylated xenobiotics and endobiotics catalyzed by expressed human UGT1.4 protein. *Drug Metab Dispos.* 1996;24(3):356-63.

- 5) Nakajima M, Tanaka E, Kobayashi T, Ohashi N, Kume T, Yokoi T. Imipramine N-glucuronidation in human liver microsomes: biphasic kinetics and characterization of UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(6):636-42.
- 6) Nakajima M, Tanaka E, Kwon JT, Yokoi T. Characterization of nicotine and cotinine N-glucuronidations in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(12):1484-90.
- 7) Kaku T, Ogura K, Nishiyama T, Ohnuma T, Muro K, Hiratsuka A. Quaternary ammonium-linked glucuronidation of tamoxifen by human liver microsomes and UDP-glucuronosyltransferase 1A4. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(11):2093-102.
- 8) Kitamura Y, Moriguchi M, Kaneko H, Morisaki H, Morisaki T, Toyama K, and Kamatani N. Determination of probability distribution of diplotype configuration (diplotype distribution) for each subject from genotypic data using the EM algorithm. *Ann Hum Genet* 2002;66:183-193.
- 9) Ehmer U, Vogel A, Schutte J.K, Krone B, Manns MP, Strassburg CP. Variation of hepatic glucuronidation: Novel functional polymorphisms of the

UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4.
Hepatology, 2004;39: 970-977.

10) Wiener D, Fang JL, Dossett N,
Lazarus P. Correlation between
UDP-glucuronosyltransferase genotypes
and

4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-but
anone glucuronidation phenotype in
human liver microsomes. Cancer Res.
2004;64(3):1190-6.

11) Mori A, Maruo Y, Iwai M, Sato H,
Takeuchi Y.
UDP-glucuronosyltransferase 1A4
polymorphisms in a Japanese population
and kinetics of clozapine glucuronidation.
Drug Metab Dispos. 2005;33(5):672-5.

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

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Saeki, Y. Saito, H. Jinno, K. Sai, A.
Hachisuka, N. Kaniwa, S. Ozawa, M.
Kawamoto, N. Kamatani, K. Shirao, H.
Minami, A Ohtsu, T. Yoshida, N. Saijo, K.
Komamura, T. Kotake, H. Morishita, S.
Kamakura, M. Kitakaze, H. Tomoike and
J. Sawada: Genetic variations and
haplotypes of UGT1A4 in a Japanese
population. Drug Metab. Pharmacokinet.,
20, 144-151, 2005.

2. 学会発表

なし

Table 1. Primers utilized for *UGT1A4* amplification and sequencing

	Direction	Primer Name	Sequences	Location ^a
Amplification	forward	UGT1A4-1stF	TTAACAAAAGTAGAAGGCAGTG	135092
	reverse	UGT1A4-1stR	TGAAAACCTTGAAAATACACTAGGC	136460
Sequencing	forward	UGT1A4-1stF	TTAACAAAAGTAGAAGGCAGTG	135092
	forward	UGT1A4seqF2	GGCTGAGAGTGGAAAAGGT	145808
	forward	UGT1A4seqF3	TCCITCCTCCTATATTCCTAAGTT	164388
	reverse	UGT1A4seqR1-2	ATCAAATTCCTTCTGGGTCC	135698
	reverse	UGT1A4seqR2	AAGGGCAGAAAAAGTATGG	136119
	reverse	UGT1A4-1stR	TGAAAACCTTGAAAATACACTAGGC	136460

^a The 5'-end of each primer on AF297093.1.