

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16年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 源間 信弘

平成 19 (2007) 年 3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16年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 源間 信弘

平成 19 (2007) 年 3月

## 目 次

### I. 総合研究報告

「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

源間 信弘 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 10

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 13

総合研究報告書

「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検査装置を開発し、ヒト血液からの全自動での DNA 検出を検証した。また、代表的な薬物代謝酵素「CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、NAT2」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、血液1滴から全自動で DNA の解析が行える診断機器を試作し、ヒト血液を用いて機

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、CYP2C19、CYP2D6、NAT2 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。

### (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った。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 16 年文部科学省・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を承認後実施した。

## C. 研究成果

### (1) 全自動 DNA チップ診断機器の開発

DNA チップを使った遺伝子の検査では核酸抽出、増幅、ハイブリダイゼーション、検出、解析の 5 ステップのプロセスが必要となる。今回、これら全てのプロセスを完全全自動で行なうためのシステムを開発した。このシステムは検査装置本体、コントローラー、制御 PC から構成されており、2 検体を同時に検査できる。また、実際の検査では、核酸増幅産物によるコンタミネーションの抑制が欠かせないと考え、DNA チップを内蔵した密閉型の使い捨てカセットを作製し、カセット内で一連の反応を行うデバイスも開発した（図 1）。予め酵素などの必要な試薬の入ったカセットにヒト血液約 0.5 $\mu$ L を注入し検査装置本体にセットすると、約 2.5 時間で解析結果が出力される。今回ヒト血液を用いて、NAT2 遺伝子の 2 箇所の一塩基多型 (SNP : 590G/A、857G/A) を検出した結

果、従来法 (PCR-RFLP) による解析結果と一致しており、全自動での検査が可能であることを検証できた。

### (2) 薬物動態予測用 DNA チップの開発

CYP2C9 に関しては、\*1 (wild type) と \*3 を識別できれば日本人の場合ほぼ 100% をカバーできると報告されているので、1075A/C の SNP を解析する DNA チップを開発した。また、CYP2C19 に関しては、日本人で頻度の高い \*1 (wild type)、\*2、\*3 を検出するために、2 箇所の SNPs (681G/A、636G/A) を同時に検出できる DNA チップを開発した。更に、CYP2D6 に関しては、既存技術では解析が非常に難しい遺伝子欠損/重複を検出するための DNA チップを開発した。また、NAT2 に関しては、既に日本人対応で開発済みであった 3SNPs (341C/T、590G/A、857G/A) に加え、外国で頻度の高い \*14 と日本で新たに見つかった \*19 に対応するため、191G/A と 190C/T の計 5SNPs を同時に検出できる DNA チップを開発した。

上記 4 種類の薬物動態予測用 DNA チップの実用性を臨床検体を使って評価した結果、従来法 (PCR-RFLP 等) による解析結果と一致しており、遺伝子型を精度良く解析できることが検証できた (図 2、3)。

## D. 考察

DNA チップを用いた小型の全自動 DNA 検査システムは世界的にも殆ど例がなく、今後テーラーメイド医療への貢献が大いに期待されると考えている。

## E. 結論

1 滴の血液から簡単に DNA を解析できる、小型の全自動 DNA チップ診断機器を開発し、ヒト血液からの SNPs 検出を検証した。本事

業の成果が、テーラーメイド医療の実践に貢献できる様、今後は製品化に向けて開発を加速したい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

福田剛史, 東純一 ファーマコゲノミックス—テーラーメイド医療への道のり— 薬物代謝酵素にかかわる個人差、医学のあゆみ 209(6) 351-6 2004

Nonen S, Okamoto H, Akino M, Matsui Y, Fujio Y, Yoshiyama M, Takemoto Y, Yoshikawa J, Azuma J and 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) 414-7 2005

Kubota R, Ohno M, Yasunaga M, Yokota S, Maekura R and Azuma J. Tentative treatments for tuberculosis based on N-acetyltransferase gene polymorphism. Jpn J Therapeutic Drug Monitoring 22(4) 336-40 2005

Kato M, Ikenaga Y, Wakeno M, Okugawa G, Nobuhara K, Fukuda T, Fukuda K, Azuma J and Kinoshita T. Controlled clinical comparison of Paroxetine and Fluvoxamine considering the serotonin transporter promoter polymorphism. Int Clin Psychopharmacol 20(3) 151-6 2005

Ikenaga Y, Fukuda T, Fukuda K, Nishida Y, Naohara M, Maune H and Azuma J. The frequency of candidate alleles for CYP2D6

genotyping in the Japanese population with an additional respect to the -1584C to G substitution. Drug Metab Pharmacokinet 20(2) 113-6 2005

田邊智子, 福田剛史, 大野雅子, 景山茂, 東純一 遺伝子多型情報に基づく投与指針作成に向けて -CYP2C9-, 臨床薬理 36(5) 255-260 2005

Kubota T, Nakajima-Taniguchi C, Fukuda T, Funamoto M, Maeda M, Tange E, Ueki R, Kawashima K, Hara H, Fujio Y and Azuma J. CYP2A6 polymorphisms are associated with nicotine dependence and influence withdrawal symptoms in smoking cessation. Pharmacogenomics J 6(2) 115-9 2006

Fukuda T, Yamamoto I, Tanabe T, Ohno M, Tougou K, Takeda H, Fujio Y and Azuma J. Warfarin dose requirement for patients with both VKORC1 3673A/A and CYP2C9\*3/\*3 genotypes. Clin Pharmacol Ther 80(5) 553-4 2006

田邊智子, 大野雅子, 福田剛史, 景山茂, 東純一 遺伝子多型情報に基づく投与指針作成に向けて -CYP2C19-, 臨床薬理 37(6) 359-66 2006

Nakamura N, Ito K, Hongo S, Hashimoto K, Furutsuka M, Kubota R, Fukuda T, Ohno M, Azuma J and Gemma N. Determination of single nucleotide polymorphisms in N-acetyltransferase2 gene using an electrochemical DNA chip and an automated DNA detection system. 臨床病理 55(3) 216-23 2007

## 2. 学会発表など

2004 International Meeting of the Institute of Human Virology (Oct 31-Nov 4 2004). Rapid and Efficient Electrochemical Detection of MxA and Mannose Binding Lectin (MBL) SNPs (single nucleotide polymorphisms) in HCV (+) Patients utilizing the Toshiba GenelyzerTM. Takahashi M, Hashimoto K, Gemma N, Johnson K, Heyward S, Andersson M and Oldach D.

第 19 回日本薬物動態学会年会,2004 年 11 月 17 日~19 日 (金沢) MDR1 遺伝子多型と SSRI の臨床効果の関連性 (ABCB1(MDR1) polymorphism might be related to clinical response to paroxetine, but fluvoxamine) 福田和夫, 福田剛史, 池永有香, 加藤正樹, 分野正貴, 奥川学, 山下恵実, 延原健二, 木下利彦, 東純一

第 25 回日本臨床薬理学会年会,2004 年 9 月 17 日~18 日 (静岡) Rapid Acetylator に対するイソニアジド増量試験 窪田竜二, 大野雅子, 古塚深雪, 中山哲, 田邊智子, 蓮沼智子, 飯島肇, 山田宏美, 武部雅人, 東純一

第 25 回日本臨床薬理学会年会,2004 年 9 月 17 日~18 日 (静岡) 抗うつ薬 SSRI の臨床効果及び副作用発現に対するセロトニン受容体遺伝子多型の影響 福田和夫, 福田剛史, 加藤正樹, 分野正貴, 池永有香, 山下恵実, 奥川学, 延原健二, 木下利彦, 東純一

第 25 回日本臨床薬理学会年会,2004 年 9 月 17 日~18 日 (静岡) 血清ビリルビン値に影響を及ぼす UGT1A1 遺伝子多型の臨床的意義 田邊智子, 大野雅子, 松本京子, 安永実沙, 窪田竜二, 蓮沼智子, 飯島肇, 有沢紀子, 高附真

樹子, 武部雅人, 熊谷雄治, 東純一

8th World Congress on Clinical Pharmacology and Therapeutics 2004 2004 年 8 月 1 日~6 日 (Brisbane, Australia) Population pharmacokinetics and pharmacogenetics trial of isoniazid. Ohno M, Kubota R, Yokota S and Azuma J

第 21 回日本 TDM 学会学術大会,2004 年 6 月 5 日~6 日 (大阪) SSRI 血中濃度の個体差に影響を及ぼす因子の解析 Identification of the pharmacokinetic factors involved in variable plasma concentrations of SSRIs 福田剛史, 池永有香, 加藤正樹, 分野正貴, 福田和夫, 奥川学, 延原健二, 木下利彦, 東純一

第 21 回日本 TDM 学会学術大会,2004 年 6 月 5 日~6 日 (大阪) 薬物代謝酵素の遺伝子型情報を加味した生理学的薬物動態解析 Physiologically based pharmacokinetic analysis considering genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzyme. 大本まさのり, 大野雅子, 福田剛史, 渡邊悠貴, 赤澤堅造, 東純一

第 21 回日本 TDM 学会学術大会,2004 年 6 月 5 日~6 日 (大阪) 結核治療の適正化に向けたイソニアジドの TDM に対する提言 窪田竜二, 大野雅子, 横田総一郎, 前倉亮治, 山本裕子, 古塚深雪, 田邊智子, 東純一

The International Solid-State Circuits Conference 2006 (2006 年 2 月 4 日~7 日 @ San Francisco) Development of CMOS-integrated DNA chip for quantitative DNA analysis. Gemma N, Funaki H, Okada J and Hongo S.

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

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、福田和大、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、福田和大、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、福田和大、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 and 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 and Yokota S.

第 67 回分析討論会 2006 年 5 月 13 日 (秋田) 電気化学 DNA チップとその応用 橋本幸二

オルガテクノ 2006 2006 年 7 月 26 日 (横浜) 電気化学的手法を用いた DNA チップとその応用 橋本幸二

総合科学技術会議成果報告会 2006 年 12 月 21 日 (東京) テーラーメイド医療用 DNA チップ診断機器の開発 伊藤桂子

2007 年電子情報通信学会総合大会 2007 年 3 月 22 日 (名古屋) 電流検出型 DNA チップ 本郷禎人

第 27 回日本臨床薬理学会年会, 2006 年 11 月 29 日~12 月 1 日 (東京) Warfarin 維持投与量に対する CYP2C9 および VKORC1 遺伝子多型の影響~CYP2C9\*3/\*3 保有者の維持投与量に対する考察~ 福田剛史, 山本勇, 田邊智子, 大野雅子, 東郷克彦, 竹田晃, 藤尾慈, 東純一

第 27 回日本臨床薬理学会年会, 2006 年 11 月 29 日~12 月 1 日 (東京) Rapid Acetylator におけるイソニアジド増量時の体内動態 窪田竜二, 大野雅子, 中山哲, 徳田愛理, 加茂里美, 高橋美佳, 蓮沼智子, 飯島肇, 有沢紀子, 山本明子, 武部雅人, 東純一

医療薬学フォーラム 2006/第 14 回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2006 年 7 月 15 日

~16 日 (大阪) CYP2C9 および VKORC1 遺伝子多型と warfarin の投与量の関係 福田剛史, 山本勇, 田邊智子, 大野雅子, 東郷克彦, 竹田晃, 藤尾慈, 東純一

医療薬学フォーラム 2006/第 14 回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2006 年 7 月 15 日~16 日 (大阪) 心不全治療における beta 遮断薬反応性の個人差: beta1 アドレナリン受容体、及び CYP2D6 遺伝子多型からの検討 南畝晋平, 岡本洋, 藤尾慈, 竹本恭彦, 葭山稔, 濱口智幸, 松井裕, 早田望, 福田剛史, 吉川純一, 北島顕, 東純一

The 13th Annual Meeting of Pacific Rim Association for Clinical Pharmacogenetics 2006 (PRACP2006), June 28-30, 2006 (Changsha, China) Launched "Randomized Controlled Trial of Isoniazid for Pharmacogenomics-based Tuberculosis Therapy" Ohno M, Yokota S, Kubota R, Nakayama S, Tokuda A and Azuma J

G. 知的所有権の取得状況など (予定も含む)

1. 特許

特願 2004-199368 「核酸検出装置及び核酸検出方法」 源間信弘, 大内真一, 岡田純

特願 2004-300267 「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 2005-78977 「塩基配列判定方法、塩基配列判定システム及び塩基配列判定プログラム」 本郷禎人, 弥永真司

特願 2005-83685 「生体分子の定量分析チップ、及び、定量分析方法、定量分析装置及びシ

ステム」堀内秀紀，本郷禎人

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

特願 2006-83293 「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

特願 2007-31318 「遺伝子変異の検出方法」 中村奈緒子

特願 2007-77876 「核酸検出用デバイス」 岡田純，本郷禎人，伊藤桂子，大木健司，源間信弘

「ヒトチトクローム P450(CYP) 2D6 遺伝子欠損および遺伝子重複の検出方法およびアッセイキット」中村奈緒子，源間信弘，福田剛史，東純一

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

(その他外国出願 5 件 (予定))

2. 実用新案---なし

3. その他---なし

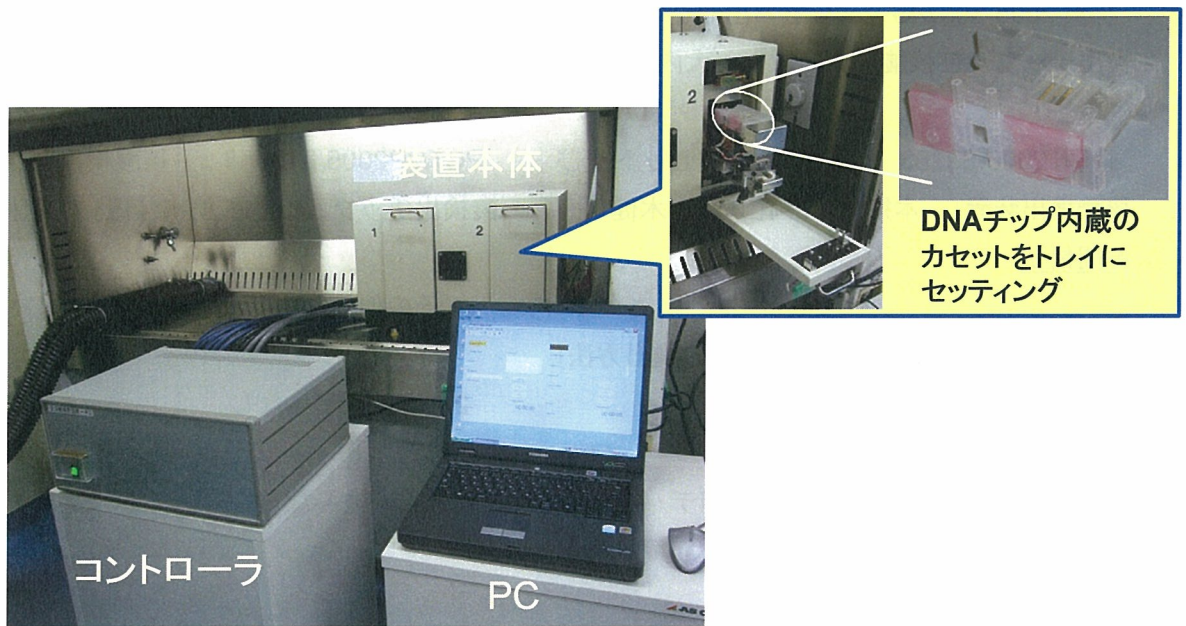


図1 試作した全自動 DNA チップ診断機器

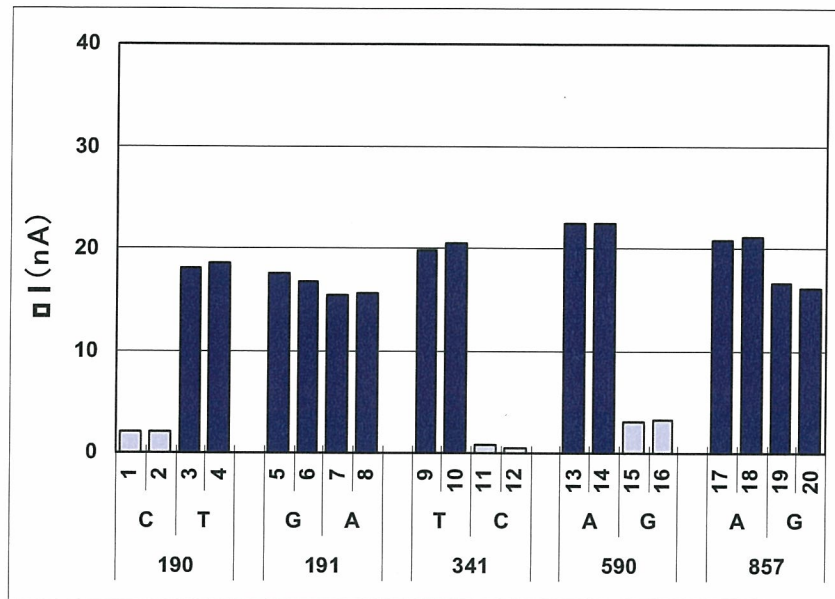


図2 NAT2 遺伝子多型検出結果の一例  
 (サンプルの遺伝子型 : 190T/T、191G/A、341T/T、590A/A、857A/G)

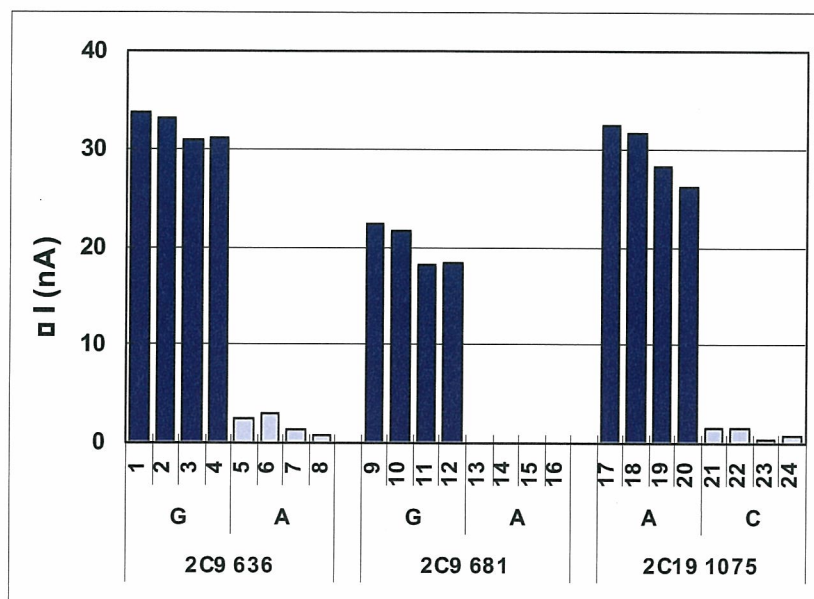


図3 CYP2C9/2C19 遺伝子多型検出結果の一例  
 (サンプルの遺伝子型 : 636G/G、681G/G、1075A/A)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
藤尾慈, 南畝晋平, 前田真貴子, 東純一, 橋本幸二, 源間信弘	薬物代謝酵素遺伝子変異解析		バイオ解析・診断技術のテーラーメイド医療への応用	シーエムシー	日本	2006	211-8
Hashimoto K, Takahashi M, Nakamura N, Ito K, Hashimoto M, Okada J, Hongo S and Gemma N	Electrochemical DNA Chip for Single-Nucleotide Polymorphism Analysis	Wong S H Y, Linder M W and Valdes R Jr	Pharmacogenomics and Proteomics	AACC Press	米国	2006	357-62

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
福田剛史, 東純一	ファーマコゲノミクスーテーラーメイド医療への道のり 薬物代謝酵素にかかわる個人差	医学のあゆみ	209(6)	351-6	2004
Nonen S, Okamoto H, Akino M, Matsui Y, Fujio Y, Yoshiyama M, Takemoto Y, Yoshikawa J, Azuma J and 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)	414-7	2005

Kubota R, Ohno M, Yasunaga M, Yokota S, Maekura R and <u>Azuma J</u>	Tentative treatments for tuberculosis based on N- acetyltransferase gene polymorphism	Jpn J Therapeutic Drug Monitoring	22(4)	336-40	2005
Kato M, Ikenaga Y, Wakeno M, Okugawa G, Nobuhara K, Fukuda T, Fukuda K, <u>Azuma J</u> and Kinoshita T	Controlled clinical comparison of Paroxetine and Fluvoxamine considering the serotonin transporter promoter polymorphism	Int Clin Psychopharmacol	20(3)	151-6	2005
Ikenaga Y, Fukuda T, Fukuda K, Nishida Y, Naohara M, Maune H and <u>Azuma J</u>	The frequency of candidate alleles for <i>CYP2D6</i> genotyping in the Japanese population with an additional respect to the -1584C to G substitution	Drug Metab Pharmacokin et	20(2)	113-6	2005
田邊智子, 福田剛史, 大野雅子, 景山茂, <u>東純一</u>	遺伝子多型情報に基づく投与指針作成に向けて -CYP2C9-	臨床薬理	36(5)	255-60	2005
Kubota T, Nakajima-Taniguchi C, Fukuda T, Funamoto M, Maeda M, Tange E, Ueki R, Kawashima K, Hara H, Fujio Y and <u>Azuma J</u>	CYP2A6 polymorphisms are associated with nicotine dependence and influence withdrawal symptoms in smoking cessation	Pharmacogenomics J	6(2)	115-9	2006

Fukuda T, Yamamoto I, Tanabe T, Ohno M, Tougou K, Takeda H, Fujio Y and <u>Azuma J</u>	Warfarin dose requirement for patients with both VKORC1 3673A/A and CYP2C9*3/*3 genotypes	Clin Pharmacol Ther	80(5)	553-4	2006
田邊智子, 大野雅 子, 福田剛史, 景 山茂, <u>東純一</u>	遺伝子多型情報に基づ く投与指針作成に向け て -CYP2C19-	臨床薬理	37(6)	359-66	2006
Nakamura N, Ito K, Hongo S, Hashimoto K, Furutsuka M, Kubota R, Fukuda T, Ohno M, <u>Azuma J</u> and <u>Gemma N</u>	Determination of single nucleotide polymorphisms in N-acetyltransferase2 gene using an electrochemical DNA chip and an automated DNA detection system	臨床病理	55(3)	216-23	2007

# 第 1 章 薬物代謝酵素遺伝子変異解析

藤尾 慈\*1, 南畝晋平\*2, 前田真貴子\*3,  
東 純一\*4, 橋本幸二\*5, 源間信弘\*6

- \*1 大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 助教授
- \*2 大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 研究員
- \*3 大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 研究員
- \*4 大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 教授
- \*5 (株)東芝 研究開発センター 事業開発室 グループ長
- \*6 (株)東芝 研究開発センター 事業開発室 技監

『バイオ解析・診断技術のテーラーメイド医療への応用』

2006年10月 シーエムシー出版刊 抜刷



# 第1章 薬物代謝酵素遺伝子変異解析

藤尾 慈\*1, 南畝晋平\*2, 前田真貴子\*3,  
東 純一\*4, 橋本幸二\*5, 源間信弘\*6

## 1 はじめに

ゲノム科学の進展は、「体質」として片付けられてきた薬効の個体差に科学的根拠を提供しつつある。遺伝子情報を広く薬物治療に応用する学問領域は、ファーマコゲノミクス (Pharmacogenomics, PGx: ゲノム薬理学) と呼ばれ、その医療への還元として、遺伝子情報を用いて個々の患者に最適化された医療を行う個別化適正医療 (テーラーメイド医療) の実現が、多くの期待を集めている。個々の薬物治療に関し PGx に基づく個別化適正医療の実現を考える場合、薬物動態学的 (Pharmacokinetic, PK) アプローチと薬力学的 (Pharmacodynamic, PD) アプローチとに分けて戦略を練る必要がある。薬物動態学的アプローチとは、薬物動態関連遺伝子 (薬物代謝酵素, 薬物トランスポーター遺伝子) に関する遺伝子情報を用いて医療の個別適正化を行うことを目指すものであり、薬力学的アプローチとは、薬物標的遺伝子の遺伝子情報を医療に用いることを意味する。薬効の個体差を考慮する場合には、PK, PD の両面からのアプローチが必要であることに疑いの余地はなく、著者らはこれらの情報をまとめて「薬効ゲノム情報」と呼んでいる。現状では、PK 関連遺伝子の解析技術の開発が格段に進んでいる。その理由としては、

- ① PGx の分野では特に薬物代謝酵素の遺伝子多型とその活性への影響に関する研究がすすんでおり、遺伝子解析の対象とする遺伝子多型がすでに絞られていること
- ② さまざまな薬物についての薬物動態の個体差が、比較的限られた薬物代謝酵素やトランスポーターの遺伝子変異で説明づけられる可能性が高く、解析結果の汎用性が期待されること

---

\*1 Yasushi Fujio 大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 助教授  
\*2 Shinpei Nonen 大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 研究員  
\*3 Makiko Maeda 大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 研究員  
\*4 Junichi Azuma 大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 教授  
\*5 Koji Hashimoto (株)東芝 研究開発センター 事業開発室 グループ長  
\*6 Nobuhiro Gemma (株)東芝 研究開発センター 事業開発室 技監

- ③ 逆に、PD の個体差を説明すると期待される薬物標的遺伝子の遺伝子多型と薬効との相関を検証するには、個々の薬剤について臨床試験を通じて検証する必要があり、未だに解析対象が十分に挙げられていないこと
- ④ 薬物標的遺伝子の遺伝子情報を用いた個別化医療の中でも期待が大きい抗癌剤の選択に関しては、癌組織での標的遺伝子の発現量の検証、(遺伝子多型以外の) 遺伝子変異の同定が要求される場合があり、ゲノム DNA を用いたチップ技術だけでは対応できないことなどが挙げられる。

さらに重要なことは、遺伝子情報を用いた個別化適正医療は、すべての疾患に対して適応されるものではなく、遺伝子解析、遺伝子情報管理に必要な費用と解析によって得られるメリットとのバランスによって、対象疾患・治療法が抽出されうると考えられる点である。従って、

- ① 遺伝子型を考慮すべき遺伝子多型の頻度がある程度高いこと
  - ② 遺伝子多型を判定せずに投薬した場合に、副作用の発現率が無視できないほどに高く、且つ発生する副作用が重篤であること
  - ③ あるいは、遺伝子多型を判定することにより、疾患の中の難治例が克服できること
- という条件を満たしていることが、具体的な医療応用への条件とならう。

これらのことを考慮し、薬物代謝酵素遺伝子多型を用いた個別化適正医療が実現され始めてい

表 1 薬物代謝酵素遺伝子多型に基づく個別化適正医療

解析対象遺伝子	対象薬剤	対象疾患・使用目的	期待される効果
CYP			
CYP 2C 9	ワーファリン	血栓性疾患	出血の回避
	トルブタミド	糖尿病	低血糖発作の回避
CYP 2C 19	PPI	消化性潰瘍	難治例の克服
CYP 2D 6	β遮断薬	高血圧, 心不全	徐脈・低血圧・心不全等の回避
	SSRI	うつ病	副作用(嘔気等)の回避と投与量設定
抱合酵素			
NAT 2	イソニアジド	結核	肝障害の回避, 難治例の克服
UGT 1A 1	イリノテカン	悪性腫瘍	骨髄抑制, 下痢の回避
その他			
MTHFR	メトトレキサート	リウマチ, 自己免疫性疾患	骨髄抑制

る分野、あるいは今後、進展しうる分野の例を表1に示す。ここで注意すべき点のひとつは、遺伝子多型の頻度、副作用発現率が白人、黒人、黄色人種間で異なることである。すなわち、人種により、遺伝子情報に基づいた個別化適正医療のもたらす恩恵が異なり、従って、実現化の社会的有効性は、個々の集団において検証されねばならないことにある。事実、最近、黒人のみを治療対象とする心不全治療薬が、FDAにより承認されている。

このように、遺伝子情報に基づいた個別化適正医療が実現するには、越えなければならないハードルはまだ多いが、現実には一部の治療薬に関して薬物代謝酵素遺伝子のゲノム情報に基づいた投与設計が行われている。例えば、2005年6月にグルクロン酸抱合酵素（UGT）の対立遺伝子型の違いによる塩酸イリノテカンの投与量の変更を求めた添付文書をFDAが承認した。このような中、遺伝子情報を迅速、安価かつ簡便に収集する技術の進歩は、PGxに基づいた個別化医療の実現がさらに大きな広がりを見せるためのdriving forceとなるであろう。

本章では、医薬工連携のもと、開発が進んでいる臨床現場での使用を目指した薬物代謝酵素の遺伝子多型判定機器に関し概説する。

## 2 DNAチップを使った遺伝子多型解析技術

DNAチップ（マイクロアレイ）は複数の塩基配列を同時に検出できるデバイスとして、遺伝子発現や遺伝子多系解析などの研究分野で広く用いられている。例えば、Affymetrix社製のGeneChipを用いると、数万種類の遺伝子を同時に検出することが可能であり、最近ではその特長を活かして診断分野にも応用され始めている<sup>1)</sup>。しかしながら、現在用いられているDNAチップのほとんどが蛍光標識を利用しているため、操作が煩雑で、蛍光ムラが生じやすいなどの問題点が指摘されている。さらに標識する蛍光色素が高価であるうえに、検出に高感度の光学系を必要とするのでシステムも大型で高額になる。そのため、これらの課題を克服する新しい技術が求められている。

### 2.1 電気化学的遺伝子検出法の原理

著者は、核酸挿入剤（インターカレーター）の電気化学反応を利用した遺伝子検出方法を開発した（図1）<sup>2~4)</sup>。この方式は、①DNAプローブが結合した金電極上で検体DNAとハイブリダイゼーション反応を行い、②形成したハイブリッド(二本鎖)部位に特異的に結合するインターカレーターを添加し、③電圧印加による挿入剤の酸化還元電流を検出する、という原理である。金電極上へプローブを固定化するために、合成DNAの末端にチオール基を導入した。チオール基と金は非常に親和性が高いため、電極表面にプローブ溶液を滴下するだけで簡単かつ強固に固

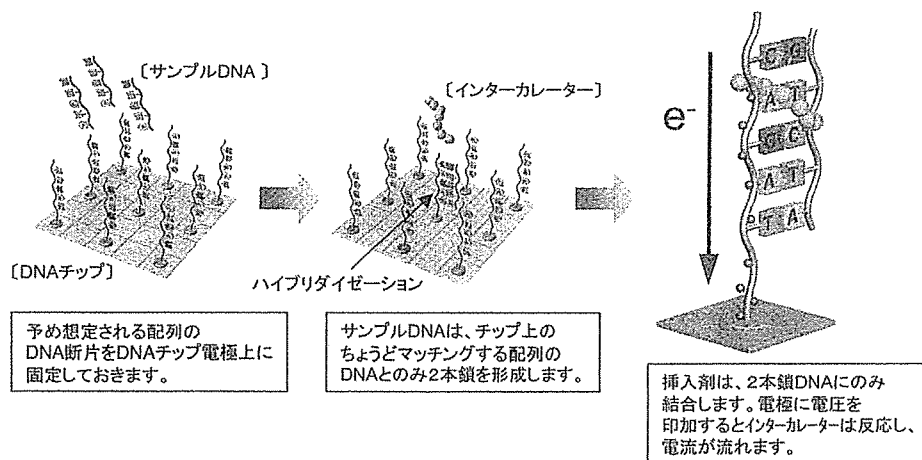


図1 インターカレーターの電気化学反応を利用した遺伝子検出法の原理

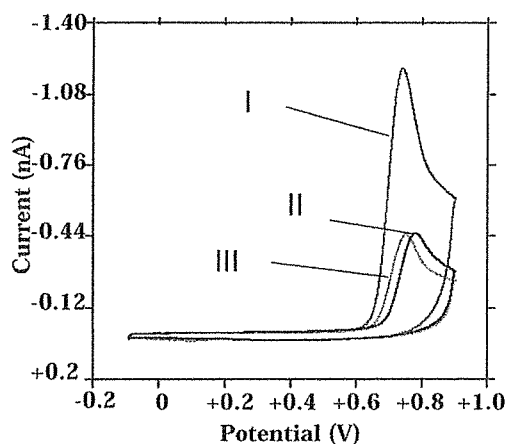


図2 ヘキスト 33258 を用いた電流検出型 DNA チップの検出例

- I : フルマッチ用プローブからの信号
  - II : ミスマッチ用プローブからの信号
  - III : ネガティブコントロール
- ターゲットとプローブが一致した場合だけ、有意な電流が観察される。

定化が可能である。インターカレーターの役割は、遺伝子ハイブリッドの量を電気化学信号に変換する点にある。インターカレーターは、古くから遺伝子や細胞の核を染める物質として使われているもので、市販品としても数十種類入手可能である。これら市販品の中から、DNA に対する特異性、電気的な特性に着目しスクリーニングを実施した結果、マイナーグループバインダーとして知られているヘキスト 33258 を用いた場合に最も良い特性が得られている (図 2)。

本方式は、煩雑な標識が不要なため検査時間が短くて済む。更に、検出系がコンパクトなので、