

システムの小型化が容易である。以上のように、蛍光方式での問題点を克服することで、研究用途のみならず、今後臨床検査など幅広い分野での利用が期待されている。

2.2 電流検出型 DNA チップ

著者らは、上述した電気化学的な原理に基づく DNA チップを開発した⁵⁻⁷⁾。電流検出型 DNA チップは、数 cm 角のガラス基板上に金電極をパターンニングしたもので、それぞれの電極上には異なる配列のプローブを固定化することができる。そのため、1 チップで複数の DNA を同時に検出することができる (図 3)。今回作製したものは、基板上に作用電極 (直径 200 μm) と、参照電極、対極が形成されており、作用電極上に DNA プローブを固定化して実験に用いた。

また、チップに合わせて専用の検査装置も開発した。従来の DNA チップを使った遺伝子検査は、高価で大型のハイブリダイゼーション装置と DNA の検出/解析装置が必要で、取り扱いにも高い専門性が要求される。著者らは、一般病院にも導入できる様に、ハイブリダイゼーション反応からデータ解析までを自動で行えるシステムを目指している^{8,9)}。写真の装置は 2 カセットを並列処理できる仕様になっており、このシステムを使うと、カセットに PCR 産物などのサンプルを注入し、あとは装置にセットするだけで自動的に検査結果が出力される。電流検出方式の簡便性、短時間検出といった長所を生かすことで、検査項目によっては 10 分程度での測定が可能になり、DNA 抽出、PCR 増幅などの前処理を含めても、数時間以内で検査が完了する。また、装置内部には、測定系、送液系、制御系が組み込まれているにもかかわらず、小型化を実現した。また、反応ユニットを増設することができるので、多検体の同時処理も可能である。

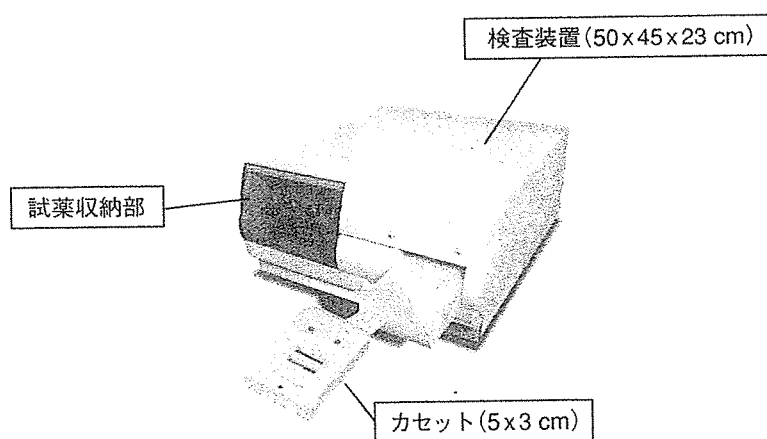


図 3 電流検出型 DNA チップカセットと検査装置

3 応用

前述した新しい解析機器を用いて、薬物代謝酵素の遺伝子多型を解析した例を次に紹介する。

3.1 NAT 2 遺伝子解析チップ

N-アセチルトランスフェラーゼ 2 (NAT 2) は、薬物のアセチル化に関与する酵素で、日本人では *NAT2* *5, *6, *7 の 3 つの遺伝子変異型を判定できれば、NAT の酵素活性がほぼ予測可能と言われている¹⁰⁾。そこで、これら変異型を判定するために 3 箇所(481 C/T, 590 G/A, 857 G/A) の一塩基多型 (SNPs) を解析する DNA チップを開発した。3 箇所の SNPs は 2 塩基置換タイプであることから、DNA チップ上には SNP 当たりそれぞれの多型に対応する 2 種類、計 6 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。既に約 100 例以上の実検体を使った試験を終了しており、PCR-RFLP の結果と 100% 一致することを確認している (図 4)。

3.2 CYP 2 C 19 遺伝子解析チップ

CYP 2 C 19 には、これまで約 20 の遺伝子型が報告されているが、日本人における CYP 2 C 19 低活性群は *CYP2 C19* *2, *3 を検出することでほぼ 100% 特定できるとされている。そこで、この 2 つのアレルを検出するために、636 G/A, 681 G/A の 2 箇所の SNPs を解析対象とする DNA チップを開発した。約 30 例の臨床検体を用いて CYP 2 C 19 チップの評価を行った結果、

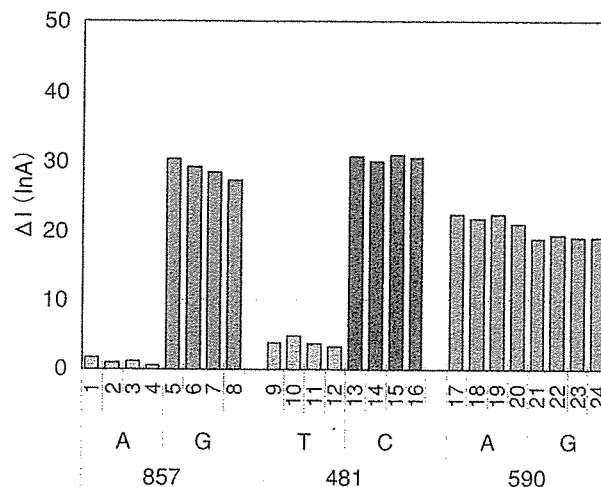


図 4 NAT 2 遺伝子多型検出結果の一例
 サンプル：血液から抽出したゲノム DNA の PCR 産物
 判定結果：481 C/C, 590 G/A, 857 G/G

全検体において従来法と一致する判定結果を得た。

3.3 CYP2C9 遺伝子解析チップ

CYP2C9 活性低下を引き起こす遺伝子型としては、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。そこで、CYP2C9*3 の判定に必要な 1075 A/C 多型を解析対象とした DNA チップを開発した。検体から抽出したゲノム DNA を増幅し DNA チップで検出した結果、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示された。

4 次世代技術開発—全自動 DNA 検査装置

DNA チップを用いた遺伝子検査では、DNA の抽出、増幅、反応、検出、解析という複数の工程が必要となる。個々の工程には煩雑な作業を必要とするので、将来的に医療の現場で DNA チップが幅広く使われるようになるためには、全工程の自動化が必要と考えられる。そこで著者らは、電流検出型 DNA チップを骨格とした全自動 DNA チップ検査装置のプロトタイプ機および DNA チップカセットを開発した。開発で最も重要視したのは、コンタミネーション対策で、その実現のために完全密閉型のカセットを基本コンセプトにした。検査に必要な試薬類および DNA チップはカセットに封入されており、検体としての血液を注入した後はカセット内で全ての反応が行われる。カセット内には廃液貯めもあるため、廃棄に際しても増幅産物が外気と接する事がない。開発したプロトタイプ機を使って血液からの全自動解析を行い、特異的な DNA 検出が可能であることを実証した。

5 まとめ

以上のように、ナノテクノロジーの目覚ましい発展に伴い、臨床現場での使用を目的とした遺伝子判定装置の開発は着実に進んでおり、一塩基置換に対する判定はほぼ満足がいくものとなっている。残された技術的な問題点は、長い領域の遺伝子欠損変異、あるいは繰り返し構造からなる遺伝子多型の判定を、一塩基置換の解析と同じシステムの中にどのように組み込むかにある。

また近い将来の問題点として、薬効ゲノム情報に基づいた医療が、従来の「さじ加減」による医療に比べ医療経済学的に優れているかどうかを明らかにするための前向き臨床研究による確証の欠如があげられるであろう。この場合、遺伝子多型頻度が人種間で異なることに加え、保健行政が各国で異なることから、臨床研究は国際的な規模での比較試験としてデザインされるべきで

ある。

最後に、多型判定機器というハード面での開発に加え、遺伝子情報管理というソフト面での技術開発を提言したい。現在の想定では、個人の遺伝子情報の保護と遺伝子多型の判定までの時間の短縮の観点から、臨床現場において遺伝子判定を行うことを前提としている。この前提に従えば、異なる疾患に罹患し、異なる医療機関を受診する場合、その度に遺伝子多型の判定を受けることになる。しかし、最初に述べたように、薬物代謝酵素の遺伝子多型情報は、様々な疾患を対象とした様々な薬物治療にも応用可能な情報であり、さらに自明のことながら患者の一生にわたり不変の情報である。従って、各人の遺伝子情報を管理保存することにより、遺伝子判定の不要な繰り返しを避けることができ、時間的・経済的節約が可能になる。各人の遺伝子情報「薬効ゲノム情報」を管理するシステムの開発について、情報保存の可否を含めて、今後、社会的な議論が必要であろう。

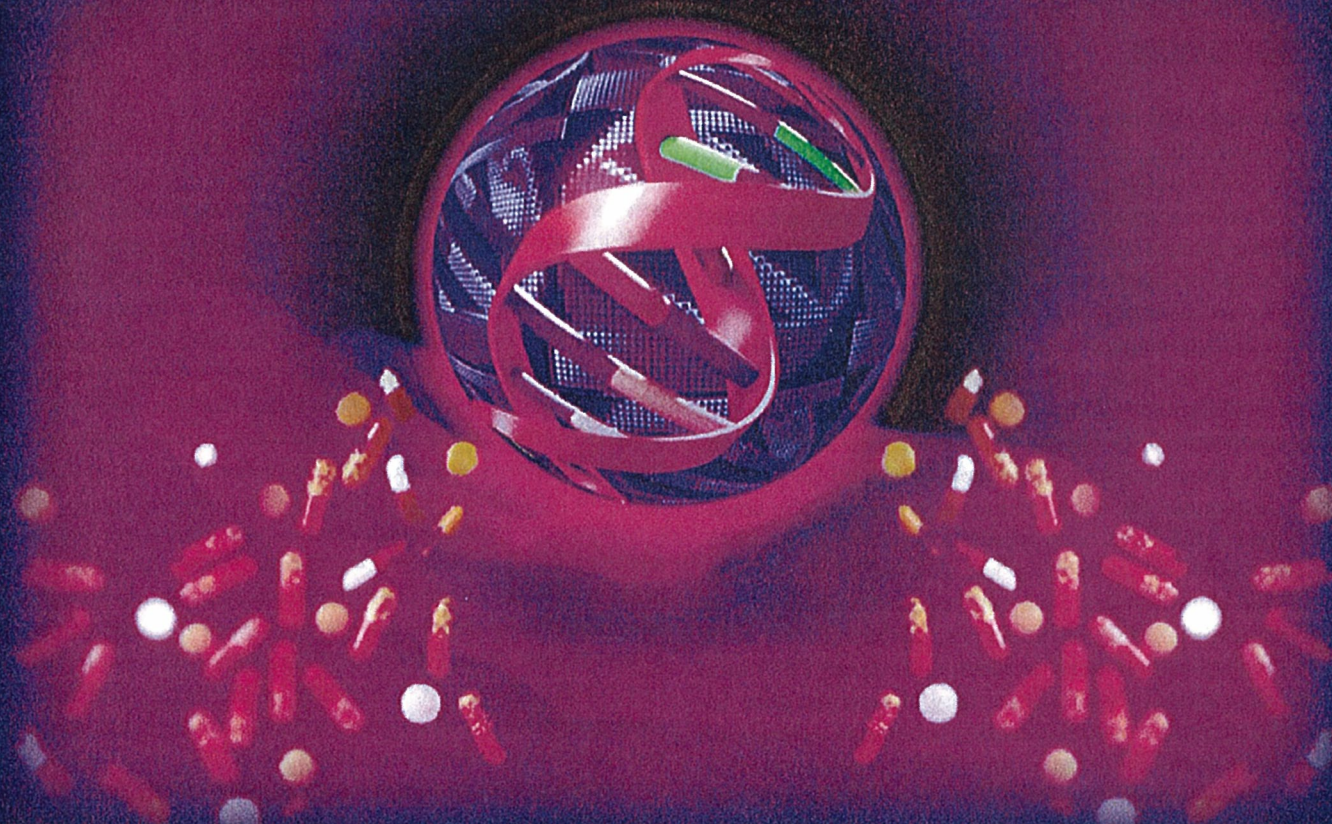
本研究の一部は、平成 14 年度(新)エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 産学官連携型産業技術実用化開発補助事業および平成 16~17 年度厚生労働科学研究費補助事業 (萌芽の先端医療技術推進研究) として行われた。また、本研究の一部は、ヒューマンサイエンス財団の支援を受けている。南畝晋平、前田真貴子は、財団法人医療機器センター流動研究員である。

文 献

- 1) W. H. Koch *et al.*, *Pharmacogenomics and Proteomics*, AACC Press, p. 331 (2006)
- 2) K. Hashimoto *et al.*, *Supramol. Chem.*, 2, 265 (1993)
- 3) K. Hashimoto *et al.*, *Anal. Chim. Acta.*, 286, 219 (1994)
- 4) K. Hashimoto *et al.*, *Sensors and Actuators, B* 46, 220 (1998)
- 5) M. Takahashi *et al.*, *Clin. Chem.*, 50, 658 (2004)
- 6) M. Takahashi *et al.*, *Analyst*, 130, 687 (2005)
- 7) T. Nakamura *et al.*, *Drug. Metab. Pharmacokinet.*, 20, 219 (2005)
- 8) 源間信弘ほか, DNA チップとリアルタイム PCR, 講談社, p. 111 (2006)
- 9) K. Hashimoto *et al.*, *Pharmacogenomics and Proteomics*, AACC Press, p. 357 (2006)
- 10) 窪田竜二ほか, 臨床検査, 48, 171 (2004)

Pharmacogenomics and Proteomics

ENABLING THE PRACTICE OF PERSONALIZED MEDICINE



EDITED BY
Steven H.Y. Wong
Mark W. Linder
Roland Valdes, Jr.

AACPPress

Electrochemical DNA Chip for Single-Nucleotide Polymorphism Analysis

Koji Hashimoto, Masayoshi Takahashi, Naoko Nakamura, Keiko Ito, Michie Hashimoto, Jun Okada, Sadato Hongo, and Nobuhiro Gemma

INTRODUCTION

The postgenome market is expected to show exponential growth following the decoding of the human genome. There are great expectations for DNA chip technology, which permits the DNA sequence and gene expression in individuals to be easily evaluated and holds the promise of DNA-based diagnosis for cancer and other common diseases. Both Affymetrix and Stanford-type DNA chips are commonly employed for the analysis of gene expression and single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the research setting, but these methods involve complicated fluorescence labeling, expensive chips, and specialized fluorescence analysis equipment (1,2). On the other hand, new technologies that avoid the above problems have been developed (3–5).

Electrochemical methods for the sequence-specific detection of target DNA have been reported from the early 1990s (6–8). These methods combine nucleic acid (probe) layers with electrochemical transducers. Some of these methods employ an electrochemically active DNA binder (i.e., an intercalator) as the hybridization indicator rather than labeling the target DNA as in conventional methods (9–13). Since they obviate the need for labeling and expensive equipment, electrochemical methods are expected to be useful for point of care (POC) applications. It is anticipated that this technology will provide rapid, accurate, and simple DNA analysis with inexpensive equipment and also promote personalized medicine, which is a key concept in the next generation of medical science.

ELECTROCHEMICAL DNA CHIP

We have been working since 1990 to develop an original electrochemical DNA chip based on the use of an electrochemically active intercalator and a probe-immobilized electrode (10–13). The most outstanding feature of this electrochemical DNA chip, which is expected to promote personalized medicine, is that it successfully combines nanotechnology, semiconductor technology, and biotechnology.

Principle of the Electrochemical DNA Chip

Synthesized oligonucleotide probes are bound to the surfaces of the electrodes of the DNA chip (Fig. 35-1). The oligonucleotide probes are modified with a thiol residue at the 5' or 3' end. It is well known that thiol residues bind strongly to gold. Therefore, the probes are easily bound to the gold electrode surface by chemisorption. Genomic DNA is extracted from a specimen such as a blood sample or a scraping from the oral mucosa using a commercially available DNA extraction kit. Target sequences are amplified by the polymerase chain reaction (PCR) method. When the amplicon is added to the chip, it reacts only with the probes that have complementary sequences, and specific double-stranded hybrids are formed on the electrode surface.

After the hybridization reaction, an intercalator solution is added to the chip. The intercalator binds specifically to the hybrids that have formed on the electrodes. About 50 different commercially available intercalators were evaluated. A minor groove binder, Hoechst 33258 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan), was found to be the most suitable for the electrochemical DNA chip due to its electrochemical properties and specificity to double-stranded DNA.

When a voltage is applied to an individual electrode, a redox current flows between the intercalator bound to the hybrid and the electrode. The sequence of the target DNA is determined by measuring this redox current. In the case of Hoechst 33258, the peak anodic current is obtained at 600 mV (Fig. 35-2).

Microfabricated Disposable Chip and Cassette

Figure 35-3 shows the structure of the disposable DNA chip. Both a titanium thin film (500 Å) and a gold thin film (5000 Å) are formed sequentially using a two-dimensional sputtering system on a Pyrex glass plate. Then, the electrode ($\phi = 500 \mu\text{m}$) is photolithographically processed on the plate using a photo-resist. The chip shown in Fig. 35-3 has 40 electrodes for probe

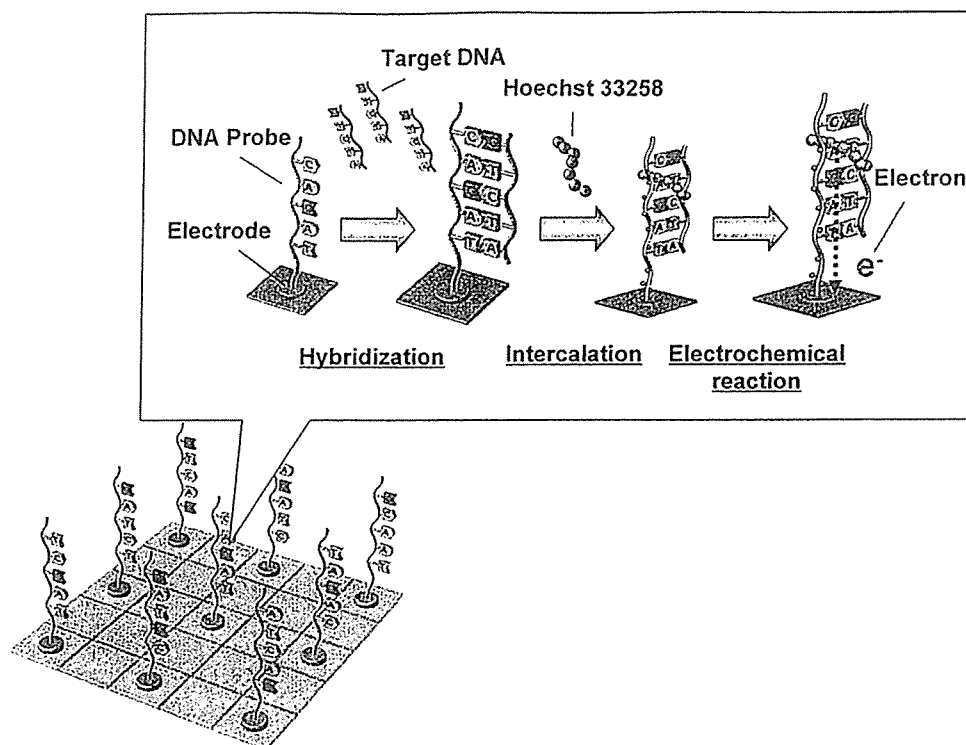


Figure 35-1 Principle of the electrochemical DNA chip based on an electrochemically active intercalator and probe-immobilized electrodes.

binding. A conventional microliquid spotting device is usually employed for probe binding. The length and sequence of the probes are designed and optimized for each target sequence.

The cassette consists of a glass chip, sample injection port, liquid flow line, electrical pad for signal transfer to the device, and bar code for data control. The chip measures 5×3 cm, and the sample volume is less than $50 \mu\text{L}$ of PCR product.

Automatic SNP Detection Device

A dedicated device for the electrochemical DNA chip has also been developed (Fig. 35-4). This device includes a liquid flow

pump, temperature controller, and electrical circuits for signal detection. The cassette is controlled by a bar code reader and is set by an autoloading mechanism. After the cassette containing the analyte such as the PCR product is set, all processes related to hybridization, washing, signal detection, and identification of the genotype are performed automatically by the dedicated device and software designed for SNPs analysis. Genotyping is performed in about 60 minutes using the standard protocol in which two samples (cassettes) are tested independently. The detection time depends on the target sequence. Only 10 minutes is needed for the detection of sequences that match perfectly.

APPLICATIONS

We are actively investigating the applications of the electrochemical DNA chip in various areas, particularly in the field of medical research, in collaboration with a number of medical institutions.

Interferon (IFN) Responsiveness Genes

Currently, about 2 million people are infected with the hepatitis C virus (carriers) in Japan, and there are thought to be about 170 million such people in the world. Although interferon is considered to be an effective agent for the treatment of hepatitis C, it is actually effective in less than one half of patients in Japan. This is due to the genetic characteristics of individual patients as well as the viral genotype. Our colleagues at Toshiba Hospital have found SNPs in more than a dozen genes, including

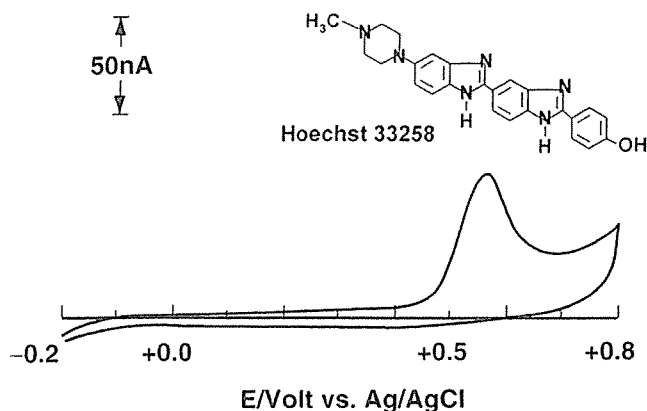


Figure 35-2 Electrochemical signal derived from Hoechst 33258 using gold electrodes.

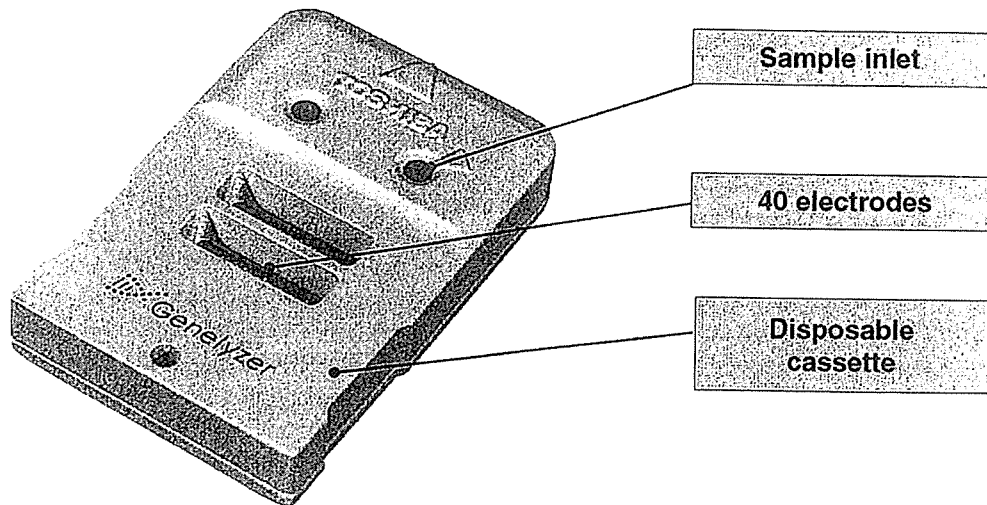


Figure 35-3 Microfabricated disposable DNA chip cassette.

myxovirus resistance-1 (MxA) and mannose binding lectin (MBL) genes, which are useful in predicting whether IFN treatment will be effective in individual patients (14–16).

We applied electrochemical DNA chip technology to analyze these IFN responsiveness genes. The DNA chip is designed to support the simultaneous genotyping of four SNPs (MxA G-88T and A-123C; MBL G-221C and G54A) that have been found to be correlated with the responsiveness of patients with

hepatitis C to IFN therapy. For the simultaneous genotyping of these four SNPs, eight allele-specific DNA probes are employed. Each probe is attached to two electrodes for validation. The target DNA solution containing four targets prepared by PCR is reacted with the probes on the chip. Figure 35-5 shows an example of the results for simultaneous detection using the electrochemical DNA chip. In this figure, the increase in peak current (ΔI) above background is shown. Each genotype can be

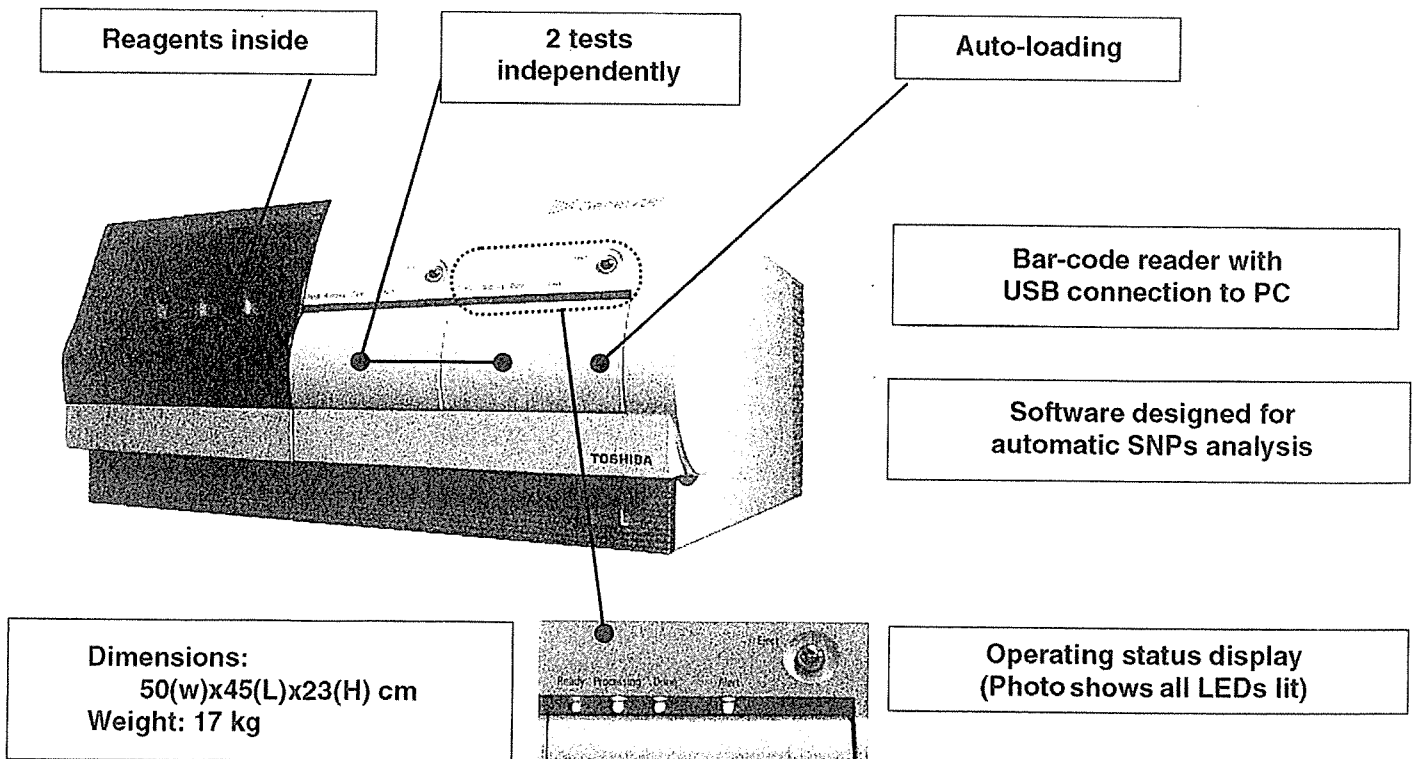


Figure 35-4 Automatic single-nucleotide polymorphism (SNP) detection device.

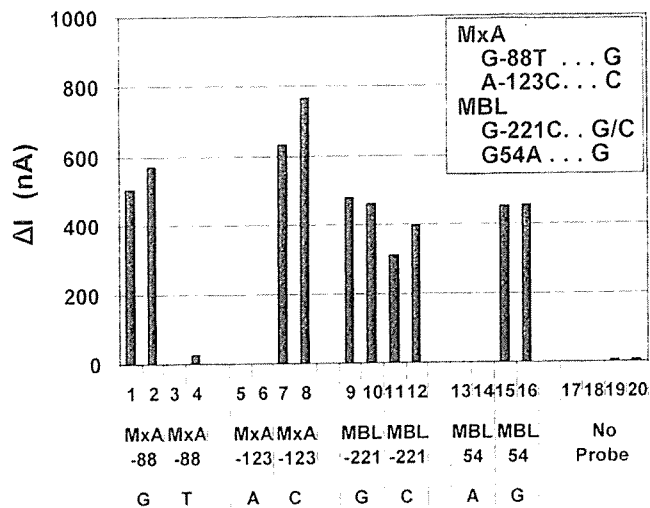


Figure 35-5 Typical data for the simultaneous detection of SNPs in the *MxA* and *MBL* genes using the electrochemical DNA chip. Inset: Genotyping results obtained by direct sequencing.

identified clearly and independently even in the presence of other targets. For comparison of genotypes, direct sequencing was also performed. The genotypes identified using the DNA chip matched perfectly with the results obtained by direct sequencing. This result suggests that the electrochemical DNA chip is as accurate as direct sequencing in identifying these genotypes. The relative standard deviations of the anodic current values for a perfect match and for a single mismatch were 2% and 3%, respectively.

Recently, other types of polymorphism of human and viral factors (genotype of HCV, mutation within the IFN sensitivity determining region [ISDR], and viral load) that are correlated with therapeutic responsiveness have been reported (17–21). The use of such genetic information in combination is expected to lead to safer and more effective treatment for hepatitis C based on the patient's individual characteristics.

***N*-Acetyltransferase-2 (NAT2)**

The rates of tuberculosis infection are increasing globally, and it is necessary to improve the recovery rate in the treatment of tuberculosis (22). However, there are marked individual differences in the effectiveness and side effects of chemotherapy for tuberculosis. In particular, antituberculosis drugs such as isoniazid are associated with liver damage, and some patients are either unresponsive or tend to relapse. Methods for predicting these risks in advance and ensuring proper therapy are urgently required.

Genetic polymorphism related to metabolic activity is present in NAT2, which is the main enzyme involved in the metabolism of isoniazid. Based on the metabolic activity of this enzyme, a patient can be classified by genotype into one of three groups: rapid acetylator (RA), intermediate acetylator (IA), or slow acetylator (SA) (23). To permit personalized medicine for

tuberculosis based on pharmacogenomics in the clinical setting, a DNA chip for NAT2 has been developed to facilitate simple and quick genotyping.

Electrochemical DNA chip technology was applied to the analysis of three polymorphic sites (T481C, A590G, and A857G) of NAT2 that are correlated with responsiveness to isoniazid in the Japanese population. To permit simultaneous genotyping, a specific DNA chip was designed and six allele-specific oligonucleotide probes were employed. The results of preliminary experiments demonstrated that the genotyping results matched perfectly with the results obtained by restriction length fragment polymorphism (data not shown).

After validating this DNA chip using clinical samples, we plan to employ it in clinical trials for personalized medicine involving antituberculosis therapy with isoniazid. This will be the first practical DNA chip in the medical field.

Multidrug Resistance Transporter (MDR1)

It is necessary to evaluate the function of P-glycoproteins such as MDR1 in order to obtain a clear understanding of the pharmacokinetics of drugs because it is involved in the absorption, distribution, and excretion of many drugs in the body. More than 20 polymorphic sites have been identified in the *MDR1* gene, including an amino acid substitution (24). However, little is known concerning the relationships between the function of P-glycoproteins and polymorphisms. It has been reported that a polymorphism at C3435T is related to the concentrations of the cardiac drug digoxin (25) and the antiretroviral drug nelfinavir in the plasma (26).

We applied electrochemical DNA chip technology to the analysis of *MDR1* polymorphism. First, the DNA chip was designed for the simultaneous genotyping of four major SNP sites (C3435T, A2677G or T, C-129T, and C1277T), and nine allele-specific DNA probes were employed. The results of preliminary experiments using PCR products showed that the genotyping results matched perfectly with the results obtained by direct sequencing (data not shown). We have just begun to study the relationships between polymorphisms and responsiveness to several drugs. *MDR1* has been reported to be related to a large number of commercially available drugs such as anticancer agents, HIV protease inhibitors, immunosuppressants, etc. This *MDR1* chip is expected to be a useful tool for the functional analysis of the *MDR1* gene.

FUTURE PROSPECTS

We have developed a novel next-generation DNA chip based on complementary metal oxide semiconductor (CMOS) technology. It has many advantages compared with conventional electrochemical DNA chips. The measurement system has been made even more compact by incorporating a current measurement circuit. High-sensitivity expression analysis has been achieved with excellent noise-resistance by integrating the sensor and the measurement circuit. This CMOS-driven DNA chip is also effective in the management of genetic data due to the incorporation of code circuits and security technology. The cost of

the chip is further reduced by employing semiconductor mass production technology.

We are also currently engaged in the development of a compact automated detection system that is able to perform all test processes, including hybridization, detection, and analysis, as well as preprocessing such as DNA extraction and amplification. This will be expected to be of great value in POC applications.

CONCLUSION

The principles and applications of electrochemical DNA chip technology have been described in this chapter. Electrochemical DNA chip technology provides a number of distinct advantages in SNPs analysis:

1. Ease of processing because labeling is not required
2. High reliability of the data obtained
3. Automatic operation from hybridization to data analysis using a dedicated device
4. Compact size
5. Low production cost for both the chip and the device

The electrochemical DNA chip shows great promise in becoming a platform for genetic testing, especially in POC applications, due to its outstanding features. It is expected to contribute to the realization of personalized medicine in the 21st century and to help promote healthy lifestyles for people everywhere.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by a grant from the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) in Japan.

We would like to thank Dr. Shunji Mishiro and Dr. Yasuhiro Furuichi for their work involving IFN responsiveness genes. We also wish to thank Dr. Junnichi Azuma and Dr. Masako Ohno for their work in NAT2 analysis. We are also grateful to Dr. Toshiyuki Sakaeda and Dr. Tsutomu Nakamura for their work in MDR1 analysis, and would like to thank Dr. Yoshio Ishimori, Dr. Hideki Horiuchi, and Dr. Shinnichi Oouchi for their contributions to this project, as well as Mr. Shigeru Wakayama, Mr. Minoru Ishikawa, Mr. Takiji Ishimura, Mr. Kenji Ooki, and Mr. Shinji Yanaga for their efforts in developing the device. Finally, we wish to thank Dr. Kiichi Adachi for his help in coordinating the submission process.

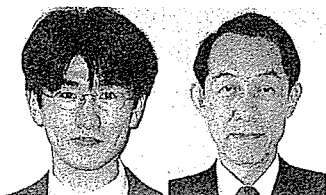
REFERENCES

1. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genet* 1999;21:10–4.
2. Cutler DJ, Zwick ME, Carrasquillo MM, Yohn CT, Tobin KP, Kashuk C, et al. High-throughput variation detection and genotyping using microarrays. *Genome Res* 2001;11:1913–25.
3. Nelson BP, Grimsrud TE, Liles MR, Goodman RM, Corn RM. Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays. *Anal Chem* 2001;73:1–7.
4. Amexis G, Oeth P, Abel K, Ivshina A, Pelloquin F, Cantor CR, et al. Quantitative mutant analysis of viral quasispecies by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12097–102.
5. Shi MM. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin Chem* 2001;47:164–72.
6. Yang M, McGovern ME, Thompson M. Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry. *Anal Chim Acta* 1997;346:259–75.
7. Mikkelsen SR. Electrochemical biosensors for DNA sequence detection. *Electroanalysis* 1996;8:15–9.
8. Drummond TG, Hill MG, Barton JK. Electrochemical DNA sensors. *Nature Biotech* 2003;21:1192–9.
9. Takenaka S, Yamashita K, Takagi M, Uto Y, Kondo H. DNA sensing on a DNA probe-modified electrode using ferrocenylnaphthalene diimide as the electrochemically active ligand. *Anal Chem* 2000;72:1334–41.
10. Hashimoto K, Miwa K, Goto M, Ishimori Y. DNA sensor: a novel electrochemical method using carbon electrode immobilized DNA probes. *Supramol Chem* 1993;2:265–70.
11. Ito K, Hashimoto K, Ishimori Y. Quantitative analysis for solid-phase hybridization reaction and binding reaction of DNA binder to hybrids using a quartz crystal microbalance. *Anal Chim Acta* 1996;327:29–35.
12. Hashimoto K, Ito K, Ishimori Y. Microfabricated disposable DNA sensor for detection of hepatitis B virus DNA. *Sens Actuators B* 1998;46:220–5.
13. Hashimoto K, Ishimori Y. Preliminary evaluation of electrochemical PNA array for detection of single base mismatch mutations. *Lab Chip* 2001;1:61–3.
14. Hijikata M, Ohta Y, Mishiro S. Identification of a single nucleotide polymorphism in the MxA gene promoter (G/T at nt –88) correlated with the response of hepatitis C patients to interferon. *Intervirology* 2000;43:124–7.
15. Hijikata M, Mishiro S, Miyamoto C, Furuichi Y, Hashimoto M, Ohta Y. Genetic polymorphism of the MxA gene promoter and interferon responsiveness of hepatitis C patients: revisited by analyzing two SNP sites (–123 and –88) in vivo and in vitro. *Intervirology* 2001;44:379–82.
16. Matsushita M, Hijikata M, Matsushita M, Ohta Y, Mishiro S. Association of mannose-binding lectin gene haplotype LXPA and LYPB with interferon-resistant hepatitis C virus infection in Japanese patients. *J Hepatol* 1998;29:695–700.
17. Sugimoto Y, Kuzushita N, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Miyagi T, et al. A single nucleotide polymorphism of the low molecular mass polypeptide 7 gene influences the interferon response in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepatitis* 2002;9:377–84.
18. Saito H, Tada S, Ebinuma H, Wakabayashi K, Takagi T, Saito Y, et al. Interferon regulatory factor 1 promoter polymorphism and response to type I interferon. *J Cell Biochem* 2001;81(Suppl 36):191–200.
19. Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, Hennig BJ, Hellier S, Zhang L, et al. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. *Genes Immun* 2003;4:411–9.
20. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene

- and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996;334:77–81.
21. Takahashi K, Iwata K, Matsumoto M, Matsumoto H, Nakao K, Hatahara T, et al. Hepatitis C virus (HCV) genotype 1b sequences from fifteen patients with hepatocellular carcinoma: the “progression score” revisited. *Hepatol Res* 2001;20:161–71.
 22. Iseman MD. Tuberculosis therapy: past, present and future. *Eur Respir J* 2003;20(Suppl 36):87s–94s.
 23. Ohno M, Yamaguchi I, Yamamoto I, Fukuda T, Yokota S, Maekura R, et al. Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:256–61.
 24. Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Pharmacogenomics* 2003;4:397–410.
 25. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3473–8.
 26. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin F, Chave JP, et al. Response to antiviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 2002;359:30–6.

薬物代謝酵素のかかわる個人差

Interindividual genetic variability in drug metabolic enzymes



福田剛史(左) 東 純一(右)

Tsuyoshi Fukuda and Jun-ichi Azuma

大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学

◎薬は“常用量でも毒”となる。この原因として薬の相互作用や加齢のような生理的要因がある。また、薬の効きすぎるヒト、効きにくいヒトの存在も知られ、この原因として、薬物代謝酵素のような薬物動態関連蛋白や、受容体のような薬物標的分子の遺伝子多型がある。本稿では、薬物代謝酵素の遺伝子多型の事例から“薬物応答の個人差”について考える。



Key word : 薬物代謝酵素, 遺伝子多型, 血中濃度

医薬品の薬効や副作用には著しい個人差が認められることがある。この個人差を説明する要因のひとつに、薬物の体内濃度を規定する主因子である薬物代謝酵素の遺伝子多型がある。ここで、お酒の例をあげれば理解しやすいであろう。同量のお酒(薬物)を飲んでも人により酔い具合(効果・副作用)が異なる。これはアルコール代謝にかかわる2種の酵素に認められる遺伝子型の違いに依存する。すなわち、各個人に対する効果の差は、薬物応答にかかわる蛋白の遺伝子上の生来の違い(遺伝子多型)により起こる。一方、薬効は薬物の投与量ではなく、薬物の生体内での挙動とその標的分子近辺の濃度に依存する。このため、薬物の代謝能を事前に予測できれば、薬の有効率を高め、また効き過ぎによる副作用を回避することが可能となる。すなわち、代謝能の違いにより各個人に最適な薬物処方量が決定されることになる。

薬物代謝酵素とは?

一般的に“薬物代謝酵素”とは生体内に取り込まれた外来異物(薬物)の生体内での構造変換を行う酵素の総称として用いられる。薬物の大半を占める脂溶性化合物は水溶性の高い構造へと変化(代

謝)され、生体外に排泄される。薬物の代謝反応には酸化、還元、加水分解、水和などの第一相反応とさらに水溶性の高い構造への抱合反応を担う第二相反応がある。これらの反応(代謝)はほとんどが肝で行われ、通常は薬効をもつ化合物は不活性代謝物となり、薬効を失う。

第一相反応の中心的な役割を果たすのが薬物代謝酵素 Cytochrome P450(CYP)である。また、抱合酵素には、UDP グルコシルトランスフェラーゼ、*N*-アセチルトランスフェラーゼ、グルタチオン *S*-トランスフェラーゼ、チオプリン *S*-メチルトランスフェラーゼ、スルホトランスフェラーゼなどがある。

これらの代謝酵素の活性には個人差があるため、生体内の薬物濃度に差が生じ、薬効に影響を及ぼす。そこで、個々の薬物(酵素の“基質”という)の代謝に関与する酵素とその寄与度を把握することが重要で、一般的に *in vitro* 系(肝ミクロソームや発現酵素)を用いて検討される。しかし、代謝全体に対する寄与の低い分子種であっても、その代謝産物が強い活性を有したり副作用に関連したりする場合もあり、注意が必要である¹⁾。

本稿では上記酵素に関する一部の例を紹介する

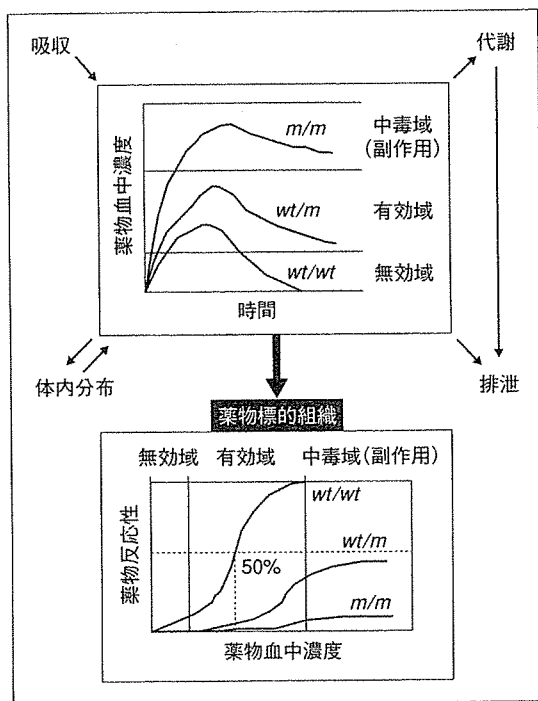


図1 薬物代謝酵素(上)および標的組織(下)の遺伝子多型と薬物反応性
wt (wild) : 正常遺伝子, *m* (mutant) : 変異遺伝子.
 (上) *wt/wt* : extensive metabolizer, *m/m* : poor metabolizer.
 (下) *wt/wt* : レスポンダー, *m/m* : ノンレスポンダー.

にとどめるが、その詳細はそれぞれの酵素を取り上げて概説している文献をご参照いただきたい^{2,3)}。

遺伝子型と表現型

薬物代謝酵素についてはそれらの遺伝子型と薬物体内動態との関連性を示唆するデータがこれまでに多く集積されている。薬物に対する代謝能に異常のない extensive metabolizer (EM) 群と代謝能の欠損する poor metabolizer (PM) 群とに大別される。PM の表現型は酵素蛋白質に何らかの問題が生じた結果として起こる。つまり酵素発現がなかったり機能しない蛋白質が発現したりする。これらは遺伝子変異によるもので、ヒトが有する2本の対立遺伝子のうちの片方(ヘテロ)あるいは両方(ホモ)の対立遺伝子に変異を有する場合に表現型が変化する。このため、個々の代謝酵素の遺伝子型を判定すれば、表現型、すなわち薬物の血中

濃度を予測することが可能となる(図1)。

これまで遺伝子多型は異常な表現型を説明するために発見された遺伝子変異が大半で、基本的には表現型(活性)と遺伝子型との相関が得られている。しかし近年、遺伝子がゲノムワイドに網羅的に解析されるようになり、表現型が明確に示されていない遺伝子変異が多数報告されるようになった。遺伝子変異がただちに活性の低下にはつながらず、変異の意義を論じるのが困難な場合も多い。最終的には個々の変異が薬物代謝酵素の構造変化や発現量の差異による活性変化につながるかを調べ、ヒト個体において個別化薬物療法を行ううえで意義のある遺伝子多型を抽出する作業が不可欠である。そのためには臨床的研究による検証が必須であることは言を俟たない。

表現型と環境因子

一方、臨床応用を論じる場合には血中濃度に反映されるみかけ上の薬物代謝活性が併用薬や個人の病態などにより変化し、かならずしも遺伝子型との相関が認められない場合があることにも注意する必要がある。遺伝子型がEMであってもPMの表現型を示すこともあり、このような現象は phenocopy といわれる。抗うつ剤のパロキセチンは単回投与ではCYP2D6遺伝子型の影響が明確に観察されるが、連続投与によりその影響はみられなくなる。これは代謝物による代謝酵素阻害に起因すると考えられている。さらに、遺伝子多型で推測される活性のみならず、その活性に影響を及ぼしうる環境因子なども相加的・相乗的に考慮する必要がある。

ヒト薬物代謝型 CYPs

CYPには多くの分子種が報告されているが、ヒト肝の薬物代謝に関与するおもなCYP分子種はCYP1A2, 2A6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, および3A5である。また、最近ではCYP2B6, 2J2, 4Fファミリーも注目されるようになった⁴⁾。これらの分子種により代謝される代表的な薬物を表1に示した。これらの分子種には遺伝子多型が報告されている。遺伝子多型の最新情報は <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/> に掲載されているので

表 1 CYPs の代表的な基質薬物

CYPs	基質薬物
CYP1A2	テオフィリン, フェナセチン, メキシレチン, イミプラミン, プロプラノロール
CYP2A6	テガフル
CYP2B6	シクロフオスファミド
CYP2C8	パクリタキセル, アミオダロン, トリグリダゾン
CYP2C9	ワルファリン, トルブタミド, グリベンクラミド, トルサミド, グリメピリド, グリピジト, フェニトイン, ジクロフェナク, テノキシカム, ナプロキセン, メフェナム酸, ピロキシカム, セレコキシブ, ロサルタン, カンデサルタン
CYP2C19	オメプラゾール, ランソプラゾール, ジアゼパム, プログアニル, アミトリプチリン, イミプラミン, ヘキサバルピタール
CYP2D6	アミトリプチリン, ノルトリプチリン, イミプラミン, デシプラミン, クロミプラミン, ハロペリドール, チオリダジン, エンカイニド, フレカイニド, プロパフェノン, メキシレチン, リドカイン, チモロール, メトプロロール, プロプラノロール, プロメタジン, メキタジン, コデイン, パロキセチン, フルボキサミン, オンダンセトロン……その他多数
CYP2E1	アセトアミノフェン, エタノール, クロルゾキサゾン
CYP2J2	エバスチン, アステミゾール
CYP3A4	カルマバゼピン, シクロスポリン, タクロリムス, ベラパミル, トリアゾラム, エリスロマイシン, イリノテカン, ステロイド類, ミダゾラム, ベラパミル……その他多数
CYP3A5	ミダゾラム, アルプラゾラム, ベラパミル, ドセタキセル, タクロリムス, ニフェジピン

参考にされたい。

薬物体内濃度を決定しうる薬物代謝酵素の遺伝子多型の影響の程度は、①遺伝子多型が直接的に酵素発現に関与する場合(遺伝子欠損やスプライスミス, ストップコドンの出現による欠損), ②薬物と異常発現酵素との親和性, ③当該酵素が基質薬物(複数の代謝酵素が関与する場合)の代謝に対する寄与度などで決定される。すなわち、個々の薬物により同じ多型でも影響の強度が異なるため、個々の薬物についてのデータが必要となる。遺伝子多型を有する分子種のうち、臨床的意義が示されているのは、CYP2D6, CYP2C9 および CYP2C19 であり(表 2)⁵⁾、2003 年 11 月に FDA からだされた業界向けのガイダンス『Pharmacogenomics Data Submission(案)』でも言及されている。

CYP2D6

CYP2D6 は、β遮断薬、抗不整脈薬、抗うつ薬、

制吐剤など多くの医薬品を代謝する酵素である。

また、合成麻薬であるメチレンジオキシメタンフェタミン(通称エクスタシー)も本酵素で代謝されることが示されている(表 1)。

CYP2D6 の遺伝子型は CYPs のなかでもっとも複雑で、40 種以上の多型が報告されている。各多型の存在比率に人種間差が認められるため、配慮すべき多型が人種により異なるのは興味深い。日本人では CYP2D6 の PM は 0.5%前後であるが、EM と比較して明らかに低活性を示す人(intermediate metabolizer (IM) とよばれる)が約 20%の頻度で存在する。IM は東洋人に特異的な CYP2D6*10/*10 や *5/*10 の遺伝子型の保有者である⁶⁾。

典型的な例として、EM と PM の薬効に対する影響を検討した phenotyping 試験の結果を示す。β遮断薬メトプロロールの代謝酵素は CYP2D6 である。この経口投与では PM の薬物血中濃度曲線下面積(AUC)は EM の約 6 倍にも達する。このとき薬効の面では β 受容体の遮断作用が強くなり、

表 2 薬物代謝酵素の活性と薬物の作用

薬物代謝酵素 (頻度)	薬剤	→ 低活性のヒトに対する反応
CYP2D6 (PM: 0.5%程度) (IM: 約 20%)	β遮断薬 (チモロール, メトプロロール, プロプラノロール) 抗不整脈 (プロパフェノン, フレカイニド) 向精神薬 (アミトリプチリン, クロミプラミン, イミプラミン チオリダジン, フルボキサミン) 抗ヒスタミン剤 (メキタジン, プロメタジンなど) コデイン, トラマドール	→ β遮断薬作用の増強(徐脈) → 催不整脈, めまい → 抗コリン作用, うつ症状の増悪, 遅延性ジスキネジア → 眠気 → 鎮痛作用減少
CYP2C9 (2C9*3: 約 4%)	ワルファリン 経口糖尿病薬 (トルブタミド, グリベンクラミド, トルサミド) フェニトイン ロサルタン	→ 出血傾向 → 低血糖症状 → 中枢障害(PHT 中毒) → 降圧効果の減少?
CYP2C19 (PM: 約 20%)	オメプラゾール ジアゼパム	→ <i>H. pylori</i> 除菌率の増加 → 鎮静効果の遅延
CYP2A6 (PM: 3~5%)	テガフル	→ 抗癌作用の低下
DPD*	5-フルオロウラシル(FU)	→ 白血球減少, 口内炎, 神経毒性
NAT-2 (SA: 約 10%)	イソニアジド サラゾスルファピリジン	→ 多発性神経炎, 肝障害 → エリトマトーデス
UGT1A1	イリノテカン	→ 下痢
TPMT (TPMT*3: 0.8%)	メルカプトプリン アザチオプリン	→ 骨髄抑制, 肝障害 → 骨髄抑制, 肝障害

*遺伝子型として明確に分けられていない。

PM では運動負荷時の心拍数の増加に対する抑制率が 18.9%で, EM の 5.3%より明らかに高い。また, コデインの副作用である消化器症状(便秘)や呼吸抑制, 縮瞳作用は EM で高頻度に観察される。これはコデインが CYP2D6 により代謝されてモルヒネとなるが, このモルヒネの薬理作用が強く現れた結果である。抗うつ薬では CYP2D6 の遺伝子多型を考慮した初期投与量設定に関する検討も進められている⁷⁾。

CYP2C9

CYP2C9 は, 抗凝固薬, 糖尿病薬, 抗てんかん薬, アンジオテンシン受容体拮抗薬や非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)などの代謝にかかわる臨床重要な酵素である。CYP2C9*1(野生型)および CYP2C9*2 と CYP2C9*3(変異型)がおもな遺伝子型である。日本人では CYP2C9*1/*3 のヘテロ接合体が約 4%の頻度で観察される。CYP2C9*

1/*3 ではワルファリンのクリアランスが CYP2C9*1/*1 に比較して 1/3 に低下すると報告され, また, ワルファリンの有効維持量が 1.5 mg/day(常用維持量 1~5 mg/day)以下の患者は変異を有している頻度が明らかに高いと報告された。フェニトインの投与設計においても, CYP2C9*1/*3 の患者では投与量を減量する必要がある。ロサルタンでは CYP2C9 による活性代謝物の濃度が CYP2C9*3 保有者で明らかに低下し, 有効率が低下する可能性が示唆されている。

CYP2C19

日本人の約 20%が CYP2C19 の PM で, これは CYP2C19*2 および CYP2C19*3 いずれかのホモ接合体およびヘテロ接合体である。CYP2C19 により代謝されるオメプラゾールを用いた *H. pylori* 除菌療法において血中濃度が初回投与時から高く維持される PM で有効率が高いと報告され, 薬物適

正投与計画に遺伝子多型を組み込む準備が進められている⁸⁾。

他の薬物代謝酵素

P450 以外にも副作用との関連性を中心に代謝酵素の遺伝子多型解析が進められている(表 2)。

N-アセチルトランスフェラーゼ 2(NAT2)には十数種の遺伝子多型が報告されているが、わが国では*5, *6, *7の変異型を判定すれば、ほぼ NAT 活性の予測が可能である。なお、野生型は NAT2*4 と命名されている。変異型をホモ接合体で有する slow acetylator(SA)(本酵素では PM とはよばれない)の患者では基質薬物の副作用が懸念される。日本人肺結核患者における結核治療薬イソニアジドとリファンピシンの併用投与で発現する肝障害の発症頻度は SA で有意に高く、イソニアジドの常用量が SA にとっては過剰である⁹⁾。

ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ(DPD)は抗癌剤 5-フルオロウラシル(5-FU)の律速酵素であり、活性の低下している患者では 5-FU による致死的な副作用が発現する。ソリブジン薬禍はソリブジンの代謝物による DPD 阻害による 5-FU 代謝活性の低下が原因であった。DPD についても多くの遺伝子変異が報告されているが、臨床的にはかならずしも多型による活性の予測には至っていない。

チオプリン S-メチルトランスフェラーゼ(TMPT)は、アザチオプリンや 6-メルカプトプリンのメチル化を触媒する酵素である。変異型として一塩基置換の変異と 5' 上流領域の繰返し配列(VNTR)が報告されている。日本人でも変異型と野生型のヘテロ接合体で白血球減少によるアザチオプリン投与中止例が報告されている。

UDP-グルコシルトランスフェラーゼ 1A1(UGT1A1)の遺伝子型では UGT1A1*28 を有する場合、イリノテカンの副作用発現率が増加するとされている。

薬物の感受性

常用量の薬物に対する薬効の個人差、すなわち治療効果や副作用の程度に個人差が生じる原因として、これまで述べてきた、①薬物代謝能に起因

する薬物血中濃度の違いだけではなく、②生体組織の薬物に対する感受性の違いも重要である(図 1)。

薬物代謝酵素やトランスポーターを含む薬動的(pharmacokinetics: PK)因子だけではなく、薬物受容体などの薬物感受性蛋白の薬力学的(pharmacodynamics: PD)因子の遺伝子レベルでの研究が進んでいる。著者らはこれら両因子を総称して“薬効ゲノム”とよんでいる。後者については他稿を参照いただきたい。今後、薬物に対する感受性を議論する場合には薬物代謝酵素などの薬物動態に関する基礎的知見を整理し、薬物血中濃度を中間指標として多因子解析を行うことが肝要である。

おわりに

薬物代謝酵素については多くの研究者の努力により表現型(血中薬物濃度)と遺伝子型とにかなりの相関が観察できるようになってきた。個人の遺伝子型情報を薬物治療に利用する技術、ゲノムと薬によるベネフィットは、副作用を軽減しつつ、確実に薬効を得ることでなければならない。そのためには、これまでの臨床成績から予測・構築される与薬設計が臨床治療の場で有効性の向上をもたらすかどうかを産官学の連携により検証する必要がある¹⁰⁾。すなわち、治療上のエンドポイントの判断に“薬効ゲノム”情報が有効であることを実証しなければならない。さらに、個別化医療のためのゲノム情報を各個人へ還元するための基盤システムを構築して、はじめて遺伝子情報に基づく精度の高い個別化適正与薬“ゲノムと薬”の実践が可能となる。

文献

- 1) Stearns, V. et al.: Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J. Natl. Cancer Inst.*, **95**(23): 1758-1764, 2003.
- 2) 澤田康文(編): 薬物動態・作用と遺伝子多型—薬物治療の患者個別化を目指した 21 世紀の新展開。医学ジャーナル社, 2001.
- 3) 東 純一: クスリに弱いヒトと困ったクスリたち。じほう, 2001.
- 4) Hashizume, T. et al.: Involvement of CYP2J2 and

- CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300** (1) : 298-304, 2002.
- 5) Meyer, U. A. : Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet*, **356**(9242) : 1667-1671, 2000.
- 6) Kirchheiner, J. et al. : Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics : the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol. Psychiatry*, 2004. [Mar. 23]
- 7) Shimizu, T. et al. : Bioinformatics research on inter-racial difference in drug metabolism II. Analysis on relationship between enzyme activities of CYP2D6 and CYP2C19 and their relevant genotypes. *Drug Metabol. Pharmacokin.*, **18**(1) : 71-78, 2003.
- 8) 古田隆久, 白井直人 : CYP2C19 の遺伝子多型と *H. pylori* の除菌療法. *遺伝子医学*, **5**(1) : 58-62, 2001.
- 9) Ohno, M. et al. : Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, **4** : 256-261, 2000.
- 10) Abbott, A. : With your genes? Take one of these, three times a day. *Nature*, **425** : 760-762, 2003.

線維筋痛症とたたかう

最新刊

未知の病に挑む医師と患者のメッセージ

監修／西岡久寿樹 聖マリアンナ医科大学教授・難病治療研究センター長
執筆／ホールネス研究会

A5判・164頁
定価 2,520円(本体 2,400円 税 5%)
ISBN4-263-20555-3

- 線維筋痛症は、欧米では頻度も高く、米国では ACR (米国リウマチ学会) から診断基準も発表されているが、わが国では診断や治療が容易でない数多いリウマチ性疾患の中でも、線維筋痛症の認知度は極めて低く、慢性疼痛を抱え原因不明の痛み苦しんでいる患者が多い(推定 100 万人)。
- 日本では 2003 年、線維筋痛症研究会の発足 (3 月) と厚生労働省の第 1 回線維筋痛症調査研究会議 (10 月) により、現在、線維筋痛症に対するキャンペーンが実施されている。
- 線維筋痛症患者は「手を当てる」ことすら、激痛を誘うため拒否する。現代医療の根本を問う病の多彩な切り口を、はじめて専門医が語り、患者が語った事例から、本症の情報を専門医・臨床医に周知してもらうことと、コメディカルスタッフの教育を緊急の課題として編集した啓蒙書!

本書のおもな内容

- | | |
|--------------------|-----------------------|
| 第一章 わが国の線維筋痛症患者の実態 | 第三章 線維筋症の診断と治療へのアプローチ |
| 第二章 未知の病に出会った医師たち | 第四章 これからの患者支援のあり方 |

●弊社の全出版物の情報はホームページをご覧ください。 <http://www.ishiyaku.co.jp/>

ISHIYAKU 医歯薬出版株式会社 / ☎113-8612 東京都文京区本駒込1-7-10 / TEL.03-5395-7610
FAX.03-5395-7611

2004年4月作成 TP

No positive association between adrenergic receptor variants of α_{2c} Del322–325, β_1 Ser49, β_1 Arg389 and the risk for heart failure in the Japanese population

Shinpei Nonen, Hiroshi Okamoto,¹ Masatoshi Akino,¹ Yutaka Matsui,¹ Yasushi Fujio, Minoru Yoshiyama,² Yasuhiko Takemoto,² Junichi Yoshikawa,² Junichi Azuma & Akira Kitabatake¹

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

¹Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, and ²Department 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, α_{2c} Del322–325, β_1 Ser49Gly and β_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 β_1 Ser49Gly and β_1 Arg389Gly polymorphisms. The allele frequency of the α_{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 β_1 Ser49, β_1 Arg389, and α_{2c} Del322–325 do not appear to be risk factors for chronic heart failure due to DCM. The α_{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 α_{2c} adrenergic receptor (AR) polymorphism with the deletion of four consecutive amino acids, α_{2c} Del322–325, and polymorphic amino acid variants of β_1 AR, Ser49Gly and Arg389Gly. These polymorphic changes result in alteration of AR function. The presynaptic

α_2 AR negatively regulates the release of norepinephrine from cardiac sympathetic nerves [3] and α_{2c} Del322–325 polymorphism shows a ‘loss-of-function’ phenotype [4]. The postsynaptic β_1 AR polymorphism, β_1 Ser49Gly, affects receptor sensitivity and promotes the downregulation of the receptor to agonists *in vitro* [5]. The change of β_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 β_1 Arg389Gly and α_{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 β_1 Ser49Gly frequency, have been raised against this study [8]. We have investigated the clinical significance of α_{2c} Del322–325, β_1 Ser49Gly, and β_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 ± 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 α_{2c} Del322–325, β_1 Ser49Gly and β_1 Arg389Gly polymorphisms was performed as described previously [4–6] with minor modifications.

Statistical analysis

Values were expressed as means \pm SD. χ^2 test of independence was used to test for associations between heart failure and allele. The 2×3 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 α_{2c} Del322–325, β_1 Ser49Gly and β_1 Arg389Gly polymorphisms in the patients and controls are shown in Table 1. The allele

Table 1

Distribution of α_{2c} and β_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	
α_{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%)	
β_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%)	
β_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 2×2 χ^2 or by 2×3 exact probability test, respectively. P-value < 0.017 (0.05/3) was considered to be significant.

Table 2Combined genotypes of β_1 AR and the risk for heart failure

β_1 Ser49Gly	β_1 Arg389Gly	Controls	Patients with heart failure	Odds ratio for heart failure (95%CI)	P-value
		No. of subjects			
≥ 1 Gly	≥ 1 Gly	119	91		
≥ 1 Gly	≥ 1 Gly	6	6	1.00	–
Ser/Ser	Arg/Arg	30	19	0.63 (0.18–2.25)	0.35
Ser/Ser	≥ 1 Gly	34	25	0.74 (0.21–2.55)	0.43
Ser/Ser	Arg/Arg	49	41	0.84 (0.25–2.79)	0.50

Subjects with at least one β_1 Gly49 allele and at least one β_1 Gly389 allele served as the reference group. Odds ratios and P-values between the reference group and each other group were determined by $2 \times 2 \chi^2$ test. P-value < 0.017 (0.05/3) was considered to be significant.

frequency of the α_{2c} Del322–325 variant was lower in patients with CHF than in controls (0.04 vs. 0.11, $P=0.011 < 0.017$, by Bonferroni correction) and the genotype frequency was not significant but showed the P-value nearly equal to the borderline of significance ($P=0.022 > 0.017$, by Bonferroni correction). The allele and genotype frequencies of the β_1 Arg389 and β_1 Ser49 variants in the patients with heart failure were consistent with those of controls.

Combined genotypes of β_1 Arg389 and β_1 Ser49 variants were not associated with the risk of heart failure (Table 2).

Discussion

The frequency of β_1 Arg389Gly and β_1 Ser49Gly polymorphisms did not differ from those in the control group, nor were there any trends, suggesting that these polymorphisms are not associated with susceptibility to CHF. Similarly, the combined genotype of β_1 Arg389Gly and β_1 Ser49Gly was not associated with the risk of CHF. However, we cannot definitely exclude the possibility that lack of association is derived from a β error problem, although the number of samples in our study was more than that in the previous study [7].

The allele frequency of the α_{2c} Del322–325 variant was statistically lower in CHF than in the controls. However, it is uncertain that the α_{2c} Del322–325 variant is a negative risk factor clinically, because the genotype frequency of this variant was of borderline significance, probably due to the low frequency of the homozygous genotype for α_{2c} Del322–325 variant in the Japanese population. Thus, considering the limitation of low genotype frequency of this polymorphism, a reasonable interpretation of our results is that α_{2c} Del322–325 vari-

ant is not a positive risk factor for CHF due to DCM in the Japanese population.

Previously, it was reported that allele frequency of α_{2c} Del322–325 positively correlated with heart failure in both the white and black populations [7]. It remains to be clarified why our data are not consistent with the previous study [7]. One possibility is that the inconsistency might be derived from the difference in the cause of heart failure. The previous study included patients with ischaemic cardiomyopathy, while we excluded ischaemia because some adrenoceptor polymorphisms are related to hypertension, a risk factor for ischaemic heart disease [9, 10]. Another possibility is that the pathophysiological significance of the adrenoceptor polymorphism is closely related to the severity of heart failure. Importantly, the ratio of the patients classified as NYHA III or IV is lower in the present study than that in the previous report [7]. It may be hypothesized that there is a racial difference in the severity of CHF. Indeed, the previous study reported that Japanese patients with congestive heart failure show low mortality [11].

In addition to healthy controls, who are all males aged between 20 and 40 years, we analysed 189 diabetes patients (58% male with an age 60.4 ± 9.8 years) who did not suffer from CHF, as an age-matched control. It was found that there were no differences in the allele and genotype frequencies of α_{2c} Del322–325 among healthy controls, male diabetes patients, and female diabetes patients (data not shown). Moreover, the allele frequency of α_{2c} Del322–325 was lower in the patients with CHF than in those with diabetes (0.04 and 0.10, respectively). Thus it is unlikely that α_{2c} Del322–325 polymorphism affected survival through other causes, resulting in the influence on allele frequency of samples.