

平成 18 年度厚生科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）
分担研究報告書

遺伝子多型検索による高血圧個別化診療の確立に関する研究
「ゲノム時代の臨床研究とイノベーション支援体制」
-分子診断技術の進歩と体外診断用医薬品（IVD）の国際統合化-

分担研究者： 佐瀬 一洋 順天堂大学臨床薬理学 教授

研究要旨：ゲノム情報をもとにした予防・診断・治療のパラダイム・シフトが期待されている。遺伝子型やハプロタイプを迅速かつ安価に決定することが可能になるなかで、質の高い臨床研究を計画・実施するための支援体制は未整備であり、基礎研究の成果を臨床に応用するいわゆる橋渡し研究に期待が高まっている。イノベーションの種を結実させるためには、薬事承認および保険適用を目指した開発が必要となるが、今年度は、近年国際統合化が進みつつある医療機器の規制に焦点を当てて、分子診断技術を体外診断用医薬品（IVD）として提供するために必要な支援体制や、克服すべき隘路について検討した。

A. 研究目的

分子診断技術を体外診断用医薬品として開発する際に考慮すべき規制要件について検討し、臨床研究支援体制を確立する。

B. 研究方法

わが国における体外診断用医薬品の規制要件を検討する。次に、米国や欧州など海外における国際統合化の動きを調査する。その上で、高血圧個別化医療の実現に向けて必要となる臨床研究支援体制を確立する。

（倫理面への配慮）

GEANE 研究は、ヘルシンキ宣言および臨床研究の倫理指針に従い、各実施医療機関の倫理審査委員会において研究実施計画書および説明同意文書の審議・承認を得た多施設共同試験である。

C. 研究結果

GEANE 研究は、高血圧の個別化医療に向けて、基礎研究の成果を臨床に応用するための橋渡し研究である。初年度である平成 17 年度には、臨床研究実施計画書（プロトコル）を作成し、臨床試験登録制度への対応、研究事務局の整備、臨床試験登録への対応等を行った。

分担研究者は、今年度、体外診断用医薬品

（IVD: In vitro diagnostics）に関する国内外の規制要件を調査検討し、分子診断技術の臨床的意義を検討するために必要な臨床評価体制について考察した。

（1）体外診断用医薬品（IVD）とは

体外診断用医薬品（IVD: in vitro diagnostics）とは、疾病の診断補助や経過観察に用いられるものである。多種多様なものが存在するが、臨床上有用な新規測定系の開発、感度・特異度・利便性等を向上させた測定系の改良が行われている。新規項目については医薬品や医療機器における「治験」に相当するものとして「臨床性能試験」が行われることとなっており、改良品については「既承認体外診断用医薬品との相関性データ」が必要とされている。

体外診断薬の臨床性能試験で大事なことは、標的疾患または異常に関して個人の診断に役立つデータを集め解析することである。統計的解析で有意になることのみでは基本的に何の意味も持たず、確実に現時点での診断にさらに有益なデータを追加することを証明しなければならない。

データの解析により、診断の補助とできる「参考正常範囲」（基準範囲）と疾病の有無の判断のための「カットオフ値」が求められ、それにより、妥当な「有病正診率」および許容で

きる「無病正診率」を示す必要がある。

依頼者または国内管理人は医療機関に文書で依頼して契約を行うが、いわゆる新 GCP に相当する規定は存在しない。被験者に対しては説明し同意を得るように要請することとされているが、IVD の特殊性を考慮した GCP を早急に整備することが望まれてきた。

(2) IVD 規制の国際統合化について

体外診断用医薬品は、わが国では薬事法上「医薬品」に分類されてきた。平成 17 年に改正薬事法が施行され、諸外国における IVD 規制との国際統合性を考慮して、「医療機器」に分類されることとなった。

低リスク IVD： 診断情報リスク（確定診断に与える寄与が比較的低いと考えられる測定項目）の中で、校正用標準物質があり自己点検が必要なもの（GOT、GPT、グルコース等約 100 項目）については、体外診基本要件（Essential Principles）を満たせば承認不要（自己認証）となったが、品質システム型の GMP が適用される。

それ以外の低リスク IVD（Hb、Ht、細菌学的検査、自己免疫測定、細胞性免疫検査等、320 項目）については、体外診基本要件に加え、相関性基準として既存品との相互比較試験を実施することが求められるが、厚生労働大臣承認ではなく、第三者機関による認証が可能となった。

その他の IVD： 診断情報リスクが比較的大きく、情報の生命維持に与える影響が大きいと考えられるものおよび新測定項目（がん、感染症診断（HIV、HCV 等）、遺伝子診断薬（NAT 等）、その他）については、米国では FDA による承認が必要であり、EU でも第三者認証を求めているため、わが国においても体外診基本要件や品質システム型 GMP を満たしているかどうかについて医薬品医療機器総合機構（PMDA）における審査を行ったのち、厚生労働大臣による承認というプロセスが必要である。

(3) 分子診断技術のイノベーション支援体制

有病群と無病群： 有病群は質の高い臨床研究により確定診断されており、その診断根拠のデータが整備されていなければならない。また、無病群は健康者あるいは該当疾患に関して罹患していない群であり、その内容は吟味され、的確に定義されていなければならない。

特別に検討すべき群： 該当疾患と鑑別すべき疾患群、測定あるいは検出項目と相同性の高

いタンパクや物質（医薬品等も含む）が存在する群、肝機能異常群、腎機能異常群、免疫疾患群（免疫反応を利用した測定系の場合は必須）等の実際の臨床検体で該当疾患を判定する際に問題になる対象で解析することが必要である。これらは偽陽性、偽陰性を示す可能性があり、それが確実である場合、臨床現場に情報を提供する必要があるからである。

D. 結論

体外診断用医薬品（IVD）の開発において、検討すべき検体が多いことは、イノベーションの実現に対する大きな障害となっている。広範囲に症例を集めることは難しく、これらの解析が不十分なまま、臨床現場で利用される場合、特異症例での干渉・妨害や、妨害薬剤・妨害物質に関する情報など、利用者側からの有効性、安全性などの性能に関する情報を集積、整理、一元的な管理の元での情報の迅速なフィードバックを行う機構の整備と支援が必要である。

また、別の問題として、目的疾病の検体収集に際しても、疾病初期、経過時等、個々の患者の様々な時期の検体が必要であるが、特に稀少疾病の場合、検体を解析に十分な数揃えることが難しい。したがって、長期にわたり採取、保存されている検体や全国から集めた検体を使用しなければいけない場合も多く、医薬品の治験とは異なった難しさがある。

これらに関しては単一研究者あるいは単一メーカーによる開発には限界があり、各学会主導による検体およびそれらの臨床データの収集解析が必要であり、学会における取り組みが期待される。

また、医薬品や治療用医療機器と比較すると、規制の国際統合化が未整備である。現在、GHTF（Global Harmonization Task Force）の第 5 分科会において医療機器の臨床評価に関する用語の定義や方法論の例示が行われているが、今後 IVD の臨床評価についても新たに専門家を招いて検討課題に加える予定となっている。

E. 結論

ゲノム時代を迎え、遺伝子情報やプロテオミクスを応用した分子診断技術が急速に発展しつつある。しかしながら、新たなバイオマーカーが良いサロゲートであることを証明するためには質の高い臨床データが必要である。分担研究者らは、高血圧の至適治療に関する先進的

な大規模臨床研究である GEANE 研究の実施を通じて、臨床評価の国際統合化や研究支援体制の整備など新たな厚生労働行政上の課題を見出し、イノベーション推進に向けて具体的提言をまとめるべく研究を続けている。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 佐瀬一洋. 医療の質向上と臨床評価：医療機器の薬事承認および保険適用. Jpn J Cardiovasc Cath Ther. 2006; 29-37, 2006.
- 2) Study Group 5. Clinical Evidence - Key Definitions and Concepts -. SG5(PD) N1R7. Global Harmonization Task Force. April 26, 2006. www.ghtf.org.
- 3) Study Group 5. Clinical Evaluation. SG5(PD) N2R7. Global Harmonization Task Force. April 26, 2006. www.ghtf.org.

2. 学会・シンポジウム

- 1) Kazuhiro Sase. Comparing, Contrasting, Converging Japan-U.S. Device Evaluation: Academic view. Workshop with the FDA. CRT. April 3, 2006. (Washington D.C.)
- 2) Kazuhiro Sase. The Implementation for New Pharmacovigilance Strategy. DIA. April 14, 2006. (Tokyo)
- 3) Kazuhiro Sase. Harmonization by Doing (HBD) and Global Harmonization Task Force (GHTF). -Complimentary Approach for Innovative Medical Device R&D-. Kitasato-Harvard Symposium. October 25, 2006. (Tokyo)
- 4) Kazuhiro Sase, Eric Chen. Post Market Registry for Left Ventricular Assist Device. Harmonization by Doing (HBD) West Think Tank. January 10, 2007. (Durham, North Carolina)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特許取得・実用新案登録 なし

厚生科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）
分担研究報告書

遺伝子多型検索による高血圧個別化診療の確立に関する研究
—候補遺伝子アプローチによる降圧剤感受性遺伝子同定の戦略—

分担研究者 宮田 敏行 国立循環器病センター研究所 病因部 部長

研究要旨：降圧剤感受性遺伝子を同定する戦略として、降圧剤の標的タンパク質を候補と考える場合と、降圧剤の代謝などにかかわるタンパク質を候補と考える場合に分けられる。薬物の代謝などにかかわる遺伝子はチトクローム P450(CYP)やトランスポーターなどであり、これらの遺伝子の多型はこれまでの研究で集積されてきた。ここでは、薬剤代謝酵素として知られる遺伝子にミスセンス変異を起こす多型で、日本人でマイナーアレル頻度が5%以上を示すものを候補遺伝子多型として選別した。

A. 研究目的

患者個人にあった薬物治療である個別化医療の1つの柱として、ゲノム多型情報を用いることが期待されている。作用標的が異なる幾種類かの降圧薬が広く用いられているものの、どの薬剤がどういった患者の第一選択薬になるかなどの個別化医療に関しては経験に依るところが大きく、エビデンスの蓄積と収集が求められている。多くの薬剤の吸収や代謝には多種のタンパク質が関与しているので、これらの機能に影響を与える可能性があるミスセンス変異は、個別化医療を目指す研究の解析対象となる。ここでは、高血圧個別化医療の確立を目的として進めている無作為交叉前向き多施設臨床研究(GEANE 研究)の解析対象の候補遺伝子の多型の選別に関して報告する。

B. 研究方法

降圧薬の代謝や吸収にかかわる遺伝子として、チトクローム P450、トランスポーター、酸化還元酵素、転移酵素、脱水素酵素を選択した。ABI 社の Drug Metabolism Assays には、日本人でのアレル頻度情報がある。そこで、本研究では日本人のアレル頻度が5%以上のミスセンス変異を、タイピングの候補多型とした。

(倫理面での配慮) GEANE 研究は、国立循環器病センターおよび分担研究者が所属する施設の倫理委員会で審議され承認を受けた。GEANE 研究参加者は、研究目的などを説明した上で、書面にて同意をいただく。

C. 研究結果

Drug Metabolism Assays は、220 種以

上の薬物代謝関連酵素の多型（2000 種以上）をタイピングできるが、このうち、CYP でマイナーアレル頻度が5%以上のミスセンス変異を伴う多型は24種であった（表1）。CYP 以外の遺伝子でマイナーアレル頻度が5%以上のミスセンス変異を伴う多型は48種であった（表2）。CYP の多型をタイピングしたところ、CYP21A4 のH63L変異は遺伝子型のシグナルの分離が不十分であり、タイピングできなかつた。

D. 考察

降圧剤感受性遺伝子を同定する戦略として、降圧剤の標的タンパク質と降圧剤の代謝などにかかわるタンパク質が候補として考えられる。本研究では、降圧剤

の代謝などにかかわるタンパク質の中から、CYP やトランスポーターなどの遺伝子多型を選択し、GEANE 研究で収集される試料の遺伝子タイピングの準備を整えた。

E. 結論

降圧剤感受性遺伝子同定のための候補遺伝子の多型タイピングの準備を整えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録

なし

表 1. ABI Drug Metabolism Genotyping Assays のなかの、CYP のマイナーアレル頻度(日本人)が5%以上のミスセンス変異 (24 個:CYP3A4 と CYP2C9 を除く)

Gene Symbol	polymorphism	Amino Acid Change	Minor Allele Freq (Japanese) from DME index
CYP20A1	C/T	L346F	0.24
CYP4B1	C/T	R173W	0.17
CYP2A7	A/G	R311C R260C	0.41
CYP39A1	A/T	K324N	0.39
CYP2D6	A/G	R296C R245C	0.12
CYP2A7P1,CYP2B6	G/T	Q172H	0.18
CYP20A1	C/T	S97L S97L	0.1
CYP1A1	C/T	D45G	0.15
CYP2F1	C/T	S38P	0.06
CYP39A1	C/T	H103R	0.19
CYP4F11	C/T	N446D	0.41
CYP2A7	A/G	A117V A66V	0.42
CYP4F2	C/T	M433V	0.31
TNXB,C4A,CYP21A2	A/T	H63L	0.11
CYP2D6	C/G	T486S T435S	0.41
CYP3A7	C/G	T409R	0.25
CYP4F12	A/G	S522G	0.31
CYP11B2	C/T	S435G	0.44
CYP2D6		P34S P34S	
CYP2C18	C/T	T385M	0.2
FAM82A,CYP1B1	C/G	L432V	0.18
CYP4B1	AT/-	D294	0.34
CYP7A1	C/T	N347D	0.05
CYP2A7	A/C	A153S A102S	0.41

TNXB,C4A,CYP21A2(H63L) は、タイピングできなかった。

表2. ABI Drug Metabolism Genotyping Assays のなかの、CYP 以外の遺伝子のマイナーアレル頻度 (日本人) が5%以上のミスマッチ変異

Gene	Symbol	Polymorphism	Amino Acid Change	Gene Name	Minor Allele Frequency Caucasian	Minor Allele Frequency African American	Minor Allele Frequency Japanese	Minor Allele Frequency Chinese
GSTM3	C/T	I224V		glutathione S-transferase M3 (brain)	0.30	0.11	0.27	0.25
FMO3	A/G	K158E;K158E		flavin containing monooxygenase 3	0.44	0.42	0.24	0.20
FMO3	A/G	M257V;M257V		flavin containing monooxygenase 3	0.08	0.03	0.17	0.17
FMO3	A/G	E308G;E308G		flavin containing monooxygenase 3	0.15	0.01	0.23	0.19
FMO2	A/G	D36G		flavin containing monooxygenase 2 (non-functional)	0.11	0.03	0.10	0.17
FMO2	A/G	E314G		flavin containing monooxygenase 2 (non-functional)	0.10	0.04	0.30	0.27
EPHX1	C/T	H113Y		epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	0.27	0.23	0.44	0.47
SLC5A6	A/G	S481F		solute carrier family 5 (sodium-dependent vitamin transporter), member 6	0.29	0.27	0.13	0.19
SULT1C1	G/T	A255S;A256S		sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 1	0.03	0.02	0.08	0.11
SULT1C2	C/G	D5E		sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	0.31	0.21	0.30	0.05
HNMT	C/T	::T105I		histamine N-methyltransferase	0.15	0.02	0.05	0.03
UGT1A7	C/T	R208W		UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A7	0.44	0.26	0.20	0.11
UGT1A6	G/T	A7S;!		UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6	0.46	0.39	0.22	0.14
UGT1A6	A/G	T181A;!		UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6	0.40	0.26	0.20	0.10
UGT1A6	A/C	R184S;!		UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6	0.41	0.30	0.22	0.13

UGT1A1	A/G	R71G:	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1	0.00	0.00	0.20	0.11
SLC15A2	C/T	L350F	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	0.46	0.43	0.32	0.28
UGT2B11	A/G	R156C	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B11	0.10	0.24	0.05	0.02
ABCG2	G/T	K141Q	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	0.09	0.06	0.33	0.44
ADH1B	C/T	H48R	alcohol dehydrogenase IB (class I), beta polypeptide	0.06	0.00	0.14	0.31
ALDH7A1	G/T	K411Q	aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1	0.09	0.00	0.08	0.11
ALDH7A1	C/T	T384A	aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1	0.01	0.00	0.08	0.05
ALDH5A1	C/T	P182L;P182L	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1 (succinate-semialdehyde dehydrogenase)	0.01	0.00	0.07	0.05
GFX6	A/C	L13F	glutathione peroxidase 6 (olfactory)	0.32	0.33	0.48	0.48
TAP2	A/G	R651C:	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	0.03	0.02	0.13	0.01
TAP2	C/T	M577V;M577V	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	0.00	0.00	0.13	0.08
TAP2	C/T	I379V;I379V	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	0.19	0.14	0.16	0.27
TAP1	C/T	D697G	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	0.08	0.17	0.09	0.16
TAP1	C/T	I393V	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	0.16	0.17	0.09	0.28
ABCC10	C/T	T920I	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 10	0.28	0.30	0.10	0.12
GSTA2	G/T	E210A	glutathione S-transferase A2	0.10	0.33	0.26	0.20
GSTA2	C/G	T112S	glutathione S-transferase A2	0.40	0.27	0.34	0.31
GSTA2	A/G	P110S	glutathione S-transferase A2	0.02	0.01	0.08	0.10
GSTA5	C/T	I55V	glutathione S-transferase A5	0.02	0.17	0.08	0.10

SLC22A1	C/G	F160L:F160L	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1	0.20	0.01	0.19	0.20
SLC22A1	C/T	P341L:P341L	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1	0.00	0.10	0.12	0.16
SLC22A2	A/C	A270S:A270S	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2	0.21	0.10	0.14	0.13
ABCB5	C/T	T1M	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 5	0.26	0.02	0.05	0.05
ABCB5	A/G	K115E	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 5	0.34	0.49	0.28	0.24
ABCB5	A/G	K525E	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 5	0.13	0.29	0.14	0.22
PON1	C/T	Q192R	paraoxonase 1	0.19	0.38	0.39	0.41
PON1	C/T	R160G	paraoxonase 1	0.00	0.00	0.09	0.01
PON2	C/G	S311C:S299C	paraoxonase 2	0.13	0.23	0.26	0.21
PON2	C/G	A148G:A136G	paraoxonase 2	0.12	0.23	0.25	0.21
SLC13A1	C/T	N174S	solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 1	0.29	0.25	0.50	0.36
ABCB8	A/G	V135I	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 8	0.02	0.04	0.09	0.02
EPHX2	A/G	Q287R	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	0.10	0.10	0.23	0.23
ADHFE1	C/T	R401C	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1	0.47	0.27	0.44	0.35
ALDH1B1	G/T	R107L	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	0.39	0.42	0.24	0.35
SLC28A3	A/T	Y513F	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 3	0.05	0.13	0.07	0.13
SLC28A3	C/T	Y113C	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 3	0.06	0.18	0.07	0.09
ABCC2	A/G	I417V	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	0.18	0.19	0.14	0.02
ABCC8	A/C	A1369S	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8	0.32	0.09	0.35	0.27

ALDH3B2	C/T	T366A:T366A	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2	0.00	0.03	0.06	0.01
ALDH3B2	C/T	H361R:H361R	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2	0.13	0.24	0.06	0.14
ALDH3B2	A/G	R276W:R276W	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2	0.13	0.09	0.06	0.15
SLC02B1	A/G	Q312R	solute carrier organic anion transporter family, member 2B1	0.16	0.16	0.34	0.30
SLC02B1	C/T	S486F	solute carrier organic anion transporter family, member 2B1	0.01	0.29	0.32	0.17
SLC01B1	A/G	N130D	solute carrier organic anion transporter family, member 1B1	0.30	0.27	0.23	0.38
SLC01B1	C/T	A174V	solute carrier organic anion transporter family, member 1B1	0.13	0.02	0.19	0.12
ATP7B	C/T	K952R:	ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide	0.46	0.49	0.39	0.43
ATP7B	C/T	K832R:K670R	ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide	0.48	0.48	0.37	0.43
ATP7B	A/C	A406S:A406S	ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide	0.48	0.19	0.49	0.47
ABCC4	C/T	K757E	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	0.02	0.00	0.23	0.04
ABCC4	A/C	K304N	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	0.13	0.16	0.25	0.16
ABCC4	A/C	G187W	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	0.01	0.00	0.08	0.06
SLC10A2	A/C	A171S	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 2	0.08	0.05	0.30	0.21
SLC28A1	A/C	K237Q:	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 1	0.18	0.15	0.28	0.25
SLC28A1	C/T	R510C:	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 1	0.00	0.00	0.30	0.42
ALDH1A3	A/G	M386V	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	0.03	0.23	0.07	0.11
ABCC1	A/G	Q723R::Q723R:Q674R	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	0.00	0.00	0.11	0.07
ABCC6	C/T	Q1268R	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	0.27	0.07	0.16	0.08

ABCC6	G/T	Q632H	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	0.42	0.33	0.15	0.09
ABCC6	A/G	A614V	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	0.44	0.38	0.14	0.09
NQO1	A/G	P187S;P153S;P149S	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	0.23	0.18	0.35	0.45
NQO1	A/G	R139W;R139W;	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	0.02	0.01	0.05	0.02
CHST5	A/G	P297S;T318M	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 5	0.22	0.10	0.17	0.27
SPG7	A/G	T503A;	spastic paraplegia 7, paraplegin (pure and complicated autosomal recessive)	0.27	0.06	0.14	0.16
ALDH3A1	C/G	P329A	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	0.32	0.47	0.41	0.37
COMT	G/T	A72S;A22S	catechol-O-methyltransferase	0.00	0.00	0.10	0.01
COMT	A/G	M158V;M108V	catechol-O-methyltransferase	0.43	0.26	0.37	0.31
GSTT2	A/G	I139M	glutathione S-transferase theta 2	0.01	0.11	0.18	0.17
PPARA	C/T	A227V;A227V	peroxisome proliferator-activated receptor alpha	0.00	0.00	0.05	0.02

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

遺伝子多型検索による高血圧個別化診療の確立に関する研究
—遺伝子解析、遺伝子診断システムの開発—

分担研究者 花田裕典 国立循環器病センター研究所 循環分子生理部 室員

研究要旨：DNA チップを用いてゲノムワイドに 50 万 SNP 遺伝子型の決定を行った。新しいアルゴリズムを用いたソフトウェアの利用、サンプル調製など解析手法の改良等を行った。遺伝子型決定率の最悪値を 97%と設定した場合、再解析を必要とする検体は 10%未満であった。大量の遺伝子型データのより高速な管理・運用を行うことができるデータベースに改良し、臨床データとの統計学的な関連解析の効率化を図った。また、検体の収集や保存の簡便化について検討を行った。

A. 研究目的

遺伝子型をゲノム網羅的に決定し、降圧剤に対する応答に関連する SNP(遺伝子多型)を探索し、診断や、薬剤選択などの治療などの応用システムを開発する。

B. 研究方法

(1) GeneChip(Affymetrix 社)を利用して、ゲノム網羅的に 50 万 SNP 遺伝子型を迅速に、効率よく決定すること

(2)複雑に絡み合う遺伝子型、臨床データ等の要因を考慮して、薬剤に対する応答性に関連する遺伝子型を選択するために、データベースを改良すること

(3) 検体の収集や保存の簡便化のために、特殊な濾紙、FTA カード(Whatman 社)の利用可能性について検討すること

C. 研究結果

(1) 遺伝子型解析について

前年度 90%程度の遺伝子型決定率であったが、利用するソフトウェアの変更、解析手法のさらなる改良によって、決定率は平均 98%に改善された。その結果、99.9%以上の SNP サイトで、90%以上の検体の遺伝子型のデータの利用が可能となる決定率を 97%という高い基準に設定することが可能になった。また、前年度と同じ専従者 1.5 人で 60 検体/月を解析することが可能になった。

(2) データベースについて

前年度(17 年度)、作製したデータベースは 30 検体程度を対象にしたプロトタイプ的なものであった。18 年度は、一桁大きい数百人以上の遺伝子型データを格納し運用できるように改良を行った。データ構造自体には大きな変更はないが、公的データベースの更新に伴い、遺伝子アノテーション部分を修正した。

(3) 検体の収集、保管の簡便化について

FTA カードを用いて、乾燥状態で1ヶ月間保存した口腔粘膜からのDNAの抽出、増幅は良好だった。

D. 考察

遺伝子型決定率が大幅に改善されたので、再解析を行う基準を変更した。具体的な基準は、「97%未満の遺伝子型決定率の検体は再解析すること」と「97%未満の遺伝子型決定率の検体は全体の10%未満であること」である。これは、99.9%以上のSNP サイトについて90%以上の検体の遺伝子型データの利用が可能であることとほぼ同等である。また、解析能力は比較し2倍以上高速化することができた。データベースについては、データ構造自身には大きな変化はないので、高速化を主眼においた。

検体となる血液、DNAなどは凍結して保存しなくてはならず、収集時の輸送や長期にわたる保存にはコストがかかる。FTAカードを利用することによって、これらのコストは低下する。また採血よりも侵襲性が小さいので、医療者の検体提供者への協力の要請も行いやすく、提供者の抵抗感も軽減されることが期待できる。DNAの抽出や、増幅は良好であったことから、現在、Taqmna、GeneChipなど遺伝子型決定に利用するための最適化を行っている。

E. 結論

平成18年度内で120人の50万SNP遺伝子型を決定し、データベースに格納し

た。19年度は診断、治療等の応用システムの開発のために、臨床データとの統合化と、統計学的な解析を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）
分担研究報告書

遺伝子多型検索による高血圧個別化診療の確立に関する研究
—GEANE 研究の解析とデータマネジメントに関する研究—

分担研究者 嘉田 晃子 国立循環器病センター研究所病因部 室員

研究要旨：降圧薬感受性遺伝子多型を同定することを目的とした GEANE 研究は、3 剤 3 期のクロスオーバーデザインであり、このデザインに対する解析方法の検討を行うとともに、臨床研究を適切に実施するうえで重要なクリニカル・データマネジメントの機能について検討した。

A. 研究目的

降圧薬感受性遺伝子多型を同定することを目的とした多施設共同臨床研究において、研究データを統一して評価できる情報にまとめ、3 剤 3 期のクロスオーバーデザインに対応した解析を実施するために、方法と手順を検討する。

B. 研究方法

3 剤 3 期のクロスオーバーデザインに対応した解析方法について検討を行う。また、多施設共同研究の場合のデータマネジメント機能等を検討する。

（倫理面への配慮）

GEANE 研究は、ヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い実施している。

C. 研究結果

1) デザインと解析について

通常クロスオーバーデザインでは、薬剤、時期、順序群を含めた線型モデルを用いて解

析する。本研究では、主要なエンドポイントである血圧に対し、3 薬剤、3 時期、6 順序群をモデルに含めることとなる。さらに、各時期の間にウォッシュアウト期間を設けていないため、観察期の測定値をベースライン値として含める等の考慮が必要である。そのうえで、遺伝子多型と交互作用項を要因としてモデルに含めて、関連を検討することとなる。クロスオーバーデザインは、持ち越し効果がない場合に効率のよいデザインである。持ち越し効果が示唆される場合には、その影響を表す変数をモデルに含めることも検討すべきである。

2) データマネジメントについて

分担研究者は、複数の臨床研究に解析の立場から参画しており、クリニカル・データマネジメントについて、特に研究者主導型の臨床研究において、その重要性を感じている。データマネジメントに対する理解が低い現状において、データマネジメントの教育、普及、効率的な運用などを検討している。

クリニカル・データマネジメントは、研究

データを統一して評価できる情報にまとめることであり、研究の計画段階から最終の報告書が完成するまでの各段階でおこなわれる。データマネジメントは、実施医療機関側で行われるローカルデータマネジメントと、全実施医療機関のデータを統合して管理していくセントラルデータマネジメントに分けられ、複数の実施医療機関、事務局、データセンターが協力して進めていくものである。

ローカルデータマネジメントにおいて、研究実施上の各プロセスが、全実施医療機関で統一した手順で行われるように情報を共有することは重要である。各プロセスにおける手順を明確にし、必要に応じ手順書、マニュアルなどを作成することは有用であろう。

セントラルデータマネジメントは、事務局やデータセンターが協力し、登録システムおよびデータ管理システムを利用して、進捗管理、データの管理を行う。さらに、多様な多数の研究を効率的に進めるために、データベース体系の統一、症例報告書モジュール作成、運用手順の統一などが望まれる。

D. 考察

質の高い研究を進めていくために、データマネジメント機能が重要であり、各研究に適した方法で進めるとともに、データマネジメントの教育、普及を行い、セントラル機能の充実が必要であろう。

GEANE 研究のデータが集積されていくに伴い、効率的にデータマネジメントを行い、研究データの適切な評価へとつなげていきたい。

E. 結論

本研究のデザインに対応した解析方法について検討するとともに、研究の質を確保し、研究データの解析、適切な評価を行うために重要なクリニカル・データマネジメント機能

について検討した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

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

遺伝子多型検索による高血圧個別化診療の確立に関する研究
— 降圧薬感受性遺伝子同定のための多施設前向き臨床試験（臨床試験の推進） —

分担研究者 荻原俊男 大阪大学大学院医学系研究科老年・腎臓内科学 教授

研究要旨：高血圧感受性遺伝子の意義を検証するためには、降圧薬による治療反応性やコホート研究における経時的な臨床指標の変化との関連検証が重要である。今回、交感神経活性と密接な関係を有するβアドレナリン受容体の各種多型が、肥満者におけるレプチン依存性交感神経活性に影響を及ぼしていることが示され、メタボリックシンドロームにおける交感神経調節の重要性を示唆したほか、脈派伝播速度や心肥大といった動脈硬化進展との関連性も示され、予後規定因子となりうる可能性が示唆された。今後、これら環境・遺伝相互作用を、GEANE 研究を中心に降圧薬反応性等において検証する必要があると考えられた。

A. 研究目的

循環器疾患発症予防のためには、個人の体質にあった個別の施策を勘案することが厚生労働行政において重要である。降圧薬は重篤な心血管病予防に一定の効果をおよぼしているが、その投与方法は血圧のみを指標に手探りで行われているのが現状である。本研究では高血圧の発症や進展、降圧薬の反応性や副作用発現と関連する遺伝子の解析を行った。

B. 研究方法

対象者として遺伝子解析へのインフォームドコンセントの得られた大阪大学医学部附属病院老年・高血圧内科および関連病院受診者を対象として、昨年度に引き続きβ2 アドレナリン受容体遺伝子 (*ADRB2*) の Arg16Gly, Gln27Glu 多型、β3

アドレナリン受容体遺伝子 (*ADRB3*) の Trp64Arg 多型と、β1 アドレナリン受容体遺伝子 (*ADRB1*) の Ser49Gly, Arg389Gly 多型を検討した。統計学的解析は JMP5.1.1 (SAS Inc.) を用いて行った。

（倫理面への配慮）「降圧薬感受性遺伝子同定のための前向き多施設臨床試験 (GEANE 研究)」についての研究計画は大阪大学ヒトゲノム研究倫理委員会による承認を受けている (許可番号：121)。

C. 研究結果

大阪大では、5年間にわたる血圧、体重の変動を詳細に検討した集団において、*ADRB2*/Gly16 アレルと *ADRB2*/Gln27 アレル保有者の頻度が BMI25 以上の肥満者において非肥満者に比し有意に大であり、体脂肪量、血清レプチン濃度、

waist/hip 比と関連していた。全対象者において血清レプチン濃度はノルエピネフリン増加とも関連していたが、その関連性は *ADRB2/Gly16* アレルと *ADRB2/Gln27* アレル保有者において有意に大であった¹。また臨床における動脈硬化の指標である脈派伝播速度 (PWV) と血管拡張反応性が *ADRB1/Gly49* と有意な関連性を認め、心臓超音波検査における心肥大が *ADRB2/Gln27* と有意な関連性を認めた²。

D. 考察

メタボリックシンドロームのガイドラインが発表され、アディポサイトカインと高血圧、環境因子との相互作用も少しずつ明らかになっている。本年度解析では、その一翼を担う交感神経系調節に関連するβアドレナリン受容体の多型を代表に、特に肥満者において、レプチン依存性交感神経活性に影響を及ぼしていることが示された。これら遺伝子多型はβ遮断薬だけでなく、各種降圧薬反応性にも関連する可能性が高く、今後の GEANE 研究参加者における検討が必要と考えられる。またメタボリックシンドローム治療としてアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) の効果が、脂肪細胞に対する作用以外にも存在することが明らかになってきており、その標的遺伝子についても同様の研究を行って行く予定である。さらに食事や運動に対する反応性との相互作用も今後の検討課題である。

一方、高血圧患者においての動脈硬化度の進展を予測する脈派伝播速度や、予後を規定する心肥大などの因子に対して、βアドレナリン受容体の多型が影響を及ぼしていることも明らかとなり、血压管理下でもこれらの因子に差が生じる可能性が示唆された。このことに対してもβ遮断薬以外の各種降圧薬反応性に関連する可能性も考えられ、今後の GEANE 研究参加者における検討が必要と考えられる。

E. 結論

疾患感受性遺伝子多型を活用し、個人の体質に応じた予防的介入や予後予測が可能となることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Masuo, K., T. Katsuya, H. Kawaguchi, Y. Fu, H. Rakugi, T. Ogihara and M. L. Tuck. Beta2-adrenoceptor polymorphisms relate to obesity through blunted leptin-mediated sympathetic activation. *Am J Hypertens* 19(10): 1084-91, 2006.

Yuan, M. Ohishi, N. Ito, K. Sugimoto, T. Takagi, M., Terai, T. Katsuya, H. Rakugi, Z. Wu and T. Ogihara. Genetic influences of beta-adrenoceptor polymorphisms on arterial functional changes and cardiac remodeling in hypertensive patients. *Hypertens Res* 29(11): 875-81, 2006.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものなし。

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

遺伝子多型検索による高血圧個別化診療の確立に関する研究
分担研究者 相馬 正義 日本大学医学部内科学講座総合内科 教授

研究要旨:高血圧症および脳梗塞に対し、候補遺伝子多型を用いて関連研究を行った。follicle-stimulating hormone receptor (FSHR)遺伝子の5'領域のSNPが転写活性に影響を与え、高血圧に関与することが判明した。また、thromboxane A2 receptor (TP)遺伝子およびTissue plasminogen activator (tPA)遺伝子多型が脳梗塞の発症に関連することが判明した。

A. 研究目的

高血圧および脳梗塞の疾患候補遺伝子または候補遺伝子領域の遺伝子多型を用いて関連研究を行い、本研究の基盤となるデータを集積する。

B. 研究方法

(1)高血圧患者と正常血圧者、脳梗塞患者と非脳梗塞患者を対象とし末梢血からゲノムDNAを抽出した。尚、採血に当たってはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に準拠し、日本大学医学部倫理委員会で承認された方法に則って書面での同意を得た。

(2) 公共データベースからFSHR遺伝子、TP遺伝子およびtPA遺伝子領域の遺伝子多型を選出し、TaqMan法およびダイレクトシーケンス法にてゲノタイプを決定した。

C. 研究結果

①FSHR遺伝子5'非翻訳領域SNP (rs1394205)が女性の本態性高血圧症と有意に関連した。また、このアレルは転写活性

に影響を与えることも明らかとなった。

② tPAおよびTP遺伝子は高血圧症との関連を認めなかったが、これらの遺伝子内SNPによるハプロタイプはいずれも脳梗塞と有意な相関が認められた。

D. 考察

今回検討したFSHR遺伝子多型は、転写活性に影響を与え、女性の血清エストロジオールのレベル及び血圧に影響することが判明した。同遺伝子のノックアウトマウスが高血圧を引き起こすことより、この遺伝子が高血圧症発症に関連する可能性は高い。この遺伝子多型が高血圧症の治療とどのように関連するか今後検討する必要がある。tPAおよびTPと脳梗塞については、更なる検討が必要と考えられる。

E. 結論

FSHR遺伝子の5'非翻訳領域の多型が遺伝子機能に影響を与え、女性の高血圧症を引き起こす可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Morita A, Nakayama T, Soma M. Association study between C-reactive protein genes and ischemic stroke in Japanese subjects. Am J Hypertens 2006 Jun;19(6):593-600.

2) Nakayama T, Kuroi N, Sano M, Tabara Y, Katsuya T, Ogihara T, Makita Y, Hata A, Yamada M, Takahashi N, Hirawa N, Umemura S, Miki T, Soma M. Mutation of the follicle-stimulating hormone receptor gene 5'-untranslated region associated with female hypertension. Hypertension. 2006 Sep;48(3):512-8. 2006

3) Saito K, Nakayama T, Sato N, Morita A, Takahashi T, Soma M, Usami R. Haplotypes of the plasminogen activator gene associated with ischemic stroke. Thromb Haemost 2006 Sep;96(3):331-6.

4) Kaneko Y, Nakayama T, Saito K,

Morita A, Sato I, Maruyama A, Soma M, Takahashi T, Sato N. Relationship between the thromboxane A2 receptor gene and susceptibility to cerebral infarction. Hypertens Res. 2006;29(9):665-71.

2. 学会発表

1) 森田昭彦、中山智祥、道場道彦、日野原重明、水谷智彦、相馬正義。健常高齢者における1C-reactive protein (CRP) 遺伝子多型と脈波伝播速度 (PWV) の関連。第13回 日本遺伝子診療学会、東京、2006.

・その他12回

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

未出願

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）
分担研究報告書

遺伝子多型検索による高血圧個別化診療の確立に関する研究

分担研究者 笹栗 俊之 九州大学大学院 医学研究院 臨床薬理学 教授

研究要旨：アドレナリン受容体関連蛋白質の遺伝子多型と β 遮断薬の薬効に関する薬理遺伝学的研究

A. 研究目的

β アドレナリン受容体遮断薬（以下 β 遮断薬）は、高血圧症・虚血性心臓病・頻脈性不整脈・心不全などの治療薬として広く用いられているが、その薬効には個人差があることが知られている。その原因のひとつとして、アドレナリン受容体関連蛋白質の遺伝子多型が関与が示唆されているが、日本人においては、確立されたエビデンスはない。そこで本研究では健常人を対象に β_1 受容体に特異性の高い遮断薬を投与し、アドレナリン受容体関連蛋白質の遺伝子多型との関連を検討した。

B. 研究方法

書面にてインフォームドコンセントを得られた健常者 67 名を対象とした。気管支喘息、50 回／分未満の徐脈、不整脈を有する者は除外した。4 時間以上空腹の後、二重盲検法にてアテノロールドライシロップ（50mg）およびプラセボを服薬してもらい、薬効は服薬前と服薬 3 時間後に自動血圧計（HEM-7471C、オムロン社）で脈拍数と血圧を測定することにより評価した。また同時に採血を施行し、血球成分より DNA を抽出し、PCR-RFLP 法により既知の β_1 アドレナリン受容体遺伝子多型（S49G, R389G）の解

析をおこない薬効との相関を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究計画は九州大学医学研究院の倫理委員会およびヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査専門委員会に承認されており、対象に対して十分な説明を行った後、書面にて同意を得ている。

C. 研究結果

脈拍数、血圧はともに、服薬後 60 分後よりアテノロール服薬群（54 名）でプラセボ群（23 名）に比べ有意に低下していた。アテノロール服薬群において遺伝子多型解析を行ったところ、S49G、R389G の変異アレル頻度はそれぞれ 0.139、0.167 であった。S49G および R389G とアテノロール投与による脈拍、血圧の変化（感受性）との関係を検討したところ、S49G では G、R389G では R ホモを有している被験者のほうが変化が大きいという従来報告されている結果と同様の傾向を認めたが、有意差はなかった。

D. 考察

海外でのこれまでの報告では細胞レベルで 389R が他の遺伝子多型と比べ、 β_1 受容体に対して高い親和性を有しているという報告（Sandilands et al. Pharmacogenetics）があ