

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

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

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 齋藤 嘉朗

平成19（2007）年3月

目 次

I. 総括研究報告

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型探索及び
そのテーラーメイド投薬への応用 ----- 1
齋藤 嘉朗

II. 分担研究報告

1. インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型探索の
ための臨床パネルの作成および新規候補遺伝子の探索 ----- 13
安田 和基

2. インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連候補遺伝子の多型解析
----- 22
齋藤 嘉朗

3. インスリン分泌促進型経口糖尿病薬による二次無効発現に関するゲノム網羅
的遺伝子多型解析 ----- 31
前川 京子

4. インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型に関する
機能解析 ----- 36
埴岡 伸光

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 49

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 51

I. 総括研究報告

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

主任研究者 齋藤嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長

研究要旨： インスリン分泌促進型経口糖尿病薬、特にスルホニルウレア剤の薬効最適化とその持続を目指して、患者毎の遺伝子型に基づく投薬法（投薬量及び薬物選択法）を確立することを目的とする。一次無効との相関解析では、134名のグリメピリド投与患者検体につき、これまでに薬効・薬物動態関連7遺伝子の多型同定・ハプロタイプ推定が終了した。また、*CYP2C19*で同定したアミノ酸置換を伴う新規遺伝子多型2種につき、*in vitro*機能解析を行い、うち1種で機能低下を確認した。グリメピリドによるHbA1c値の減少率を応答変数として相関解析を行い、単相関解析で3種の有意なハプロタイプを見いだした。さらに多変量解析を行い、遺伝子型を説明変数として含む薬効予測モデルをほぼ確立した。一方、二次無効との相関解析では、二次無効群83例、長期有効群（対照群）290例、早期無効群16例のゲノム解析用臨床パネルを作成した。二次無効群では糖尿病家族歴陽性率が高く、また細小血管障害のうち特に高血糖に強く依存する神経障害、網膜症の割合が高いことから、改めて二次無効の早期予測の必要性が示唆された。また二次無効の発現機構は不明なため、*in vitro*でインスリン分泌障害モデルを確立し、二次無効を起こしやすい薬物と起こしにくい薬物により誘導が異なる遺伝子をDNAチップで検索した結果、二次無効との関連が示唆される遺伝子を見いだした。これらを追加した候補遺伝子解析では、ハプロタイプタグ多型や機能変化が報告された多型につき、昨年度より継続して開発したタイピング系等を用いて、対象となる389検体につき15遺伝子の多型解析を行い、単相関解析で3種の有意な多型を見いだした。さらに多変量解析を行い、二次無効予測モデルを試作した。またゲノム網羅的遺伝子多型解析を継続し、検出多型と二次無効との関連につき、予備的解析を行った。

分担研究者

国立国際医療センター研究所

代謝疾患研究部長

安田 和基

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科助教授 埴岡 伸光

国立医薬品食品衛生研究所

機能生化学部主任研究官 前川 京子

。糖尿病は治癒することなく、失明・腎症等の合併症を引き起こす。2型糖尿病の治療にはインスリン分泌促進型経口糖尿病薬が繁用されている。しかし、低血糖等の副作用や、一定の割合で投与初期から十分な薬効が得られない「一次無効」が起り、また一旦は薬効が得られたものの長期連用により薬効が消失する「二次無効」が約2割で発生し臨床問題となっている。これらには遺伝因子の関与も示唆されている

A. 研究目的

本邦の糖尿病患者は約900万人に達する

が、相関する遺伝子多型の報告は極めて少ない。

本研究はインスリン分泌促進型経口糖尿病薬、特にスルホニルウレア剤（以下、SU 剤）の薬効最適化とその持続の予測モデルを確立するため、新規候補遺伝子探索、候補遺伝子及び網羅的遺伝子多型解析、新規同定多型の機能解析等を行う。これらにより、患者毎の背景因子や遺伝子型に基づく投薬法（投薬量及び薬物選択法）を確立することを目的とする。

今年度は、一次無効との相関解析のために、昨年度作製したインスリン分泌促進型経口糖尿病薬の一種で第三世代の SU 剤であるグリメピリド投薬患者の臨床パネルを用いて、その薬物動態を担うトランスポーター3 種の遺伝子多型解析を行い、さらに昨年度報告した 4 種の遺伝子の多型解析結果も含めて、臨床情報（投与開始 4 ヶ月後の HbA1c 値の減少率）との相関解析を行った。また *CYP2C19* で新たに見いだされたアミノ酸置換を伴う新規多型 2 種の *in vitro* 機能解析を 2 基質につき行い、相関解析に用いた。また二次無効発現との相関解析のために、二次無効群 83 例、長期有効群（対照群）290 例、早期無効群 16 例の臨床パネルを作製した。また新規候補遺伝子探索のため、二次無効を起こしやすい薬物によるインスリン分泌障害モデルを確立し、起こしにくい薬物に比して誘導が異なる遺伝子を、DNA チップを用いて探索した。候補遺伝子多型解析では、膵β細胞からのインスリン分泌の維持に重要と思われる遺伝子で、日本人の多型情報が乏しい 2 遺伝子につきシーケンシングによる多型探索を行った。また昨年度、多型探索した遺伝子のハプロタイプタグ多型等につき、タイピング系の開発を行った。さらに、それらを用いた患

者検体の多型解析を行い、ケース群とコントロール群のアリル頻度を比較して、二次無効発現と相関する多型を探索した。また、アフィメトリクス 250 K アレイを用いたゲノム網羅的遺伝子多型解析も継続した。

B. 研究方法

1) SU 剤二次無効との相関解析のための臨床パネルの作製

SU 剤二次無効に関する遺伝子多型解析のための臨床パネルを作成した。「二次無効」の厳密な定義は存在しないが、臨床的な視点から、「一定期間 SU 剤を使用し」、かつ「その後インスリン治療へ移行した」患者群を対象とした。SU 剤開始後、早期にインスリン治療へ移行した者は、slowly progressive IDDM のように 1 型に近い病態、あるいは MODY などが含まれる可能性がある。従って、これらを除外するため、SU 剤の使用期間は 3 年以上とした。使用した SU 剤の種類については、問わなかった。

一方「長期有効群（対照群）」としては、「一定期間以上 SU 剤を使用し」、かつ「現在もインスリン治療へ移行していない」群を設定した。SU 剤の使用期間は 5 年以上とした。

さらに、「SU 剤使用期間が 3 年未満で」、かつ「インスリン治療に移行した」群を設定し「早期無効群」とした。

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

検体は、分担研究者である国立国際医療センター研究所・安田和基部長及び協力研究者である国立医薬品食品衛生研究所・頭

金正博室長を通じて練馬総合病院より供与頂いたもの（それぞれ計 463 及び 60 検体）の一部を使用した。

今年度、解析した *ABCC1*, *ABCC3*（一次無効との相関解析用）及び *NFE2L2*, *KEAP1*（二次無効との相関解析用）のシーケンシングの概略は以下の通りである。対象領域はプロモーター領域、エクソン領域およびその近傍のイントロン領域とした。ゲノム DNA を用いて、マルチプレックスのロングレンジ PCR 法にて、まず第 1 段目の増幅を行った。第 2 段目の PCR 反応は各エクソン（領域）を増幅するために行った。PCR 産物を精製後、サイクルシーケンシング反応を行い、配列を解析した。低頻度で検出された多型については、再度ゲノム DNA からの増幅・シーケンシングを行い、その存在を確認した。

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

3) タイピング系の開発

今年度は *HMOX1*, *IPF1*, *GPX1*, *ABCG2* について、ハプロタイプ解析結果に基づき、パイロシーケンシング法による簡便なタイピング系を開発し、患者検体の解析に利用した。対象は頻度約 3-5%の以上のハプロタイプのタグ多型とした。また *GCLM* の 1 多型についても、同様に開発した。まず各多型部位を含む断片をビオチン標識プライマーを用いてゲノム DNA より増幅した。PCR 産物をストレプトアビジンビーズに結合させ、アルカリ処理にて 1 本鎖化後、シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせた。これをミニシーケンシングして多型を

解析した。

4) 一次無効との相関解析

一次無効については、第 3 世代の SU 剤グリメピリドを対象とした。薬効評価項目（応答変数）として、グリメピリドの投与開始時及び投与 4 ヶ月後における糖化ヘモグロビン値（HbA1c 値）(%)より、投与後 4 ヶ月での HbA1c 値の減少率を算出し解析に用いた。これと、シーケンシング解析を行った *CYP2C9*, *CYP2C19*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *ABCC1*, *ABCC3*、及びタイピングを行った *ABCG2* につき、主としてハプロタイプを用いて相関解析した。なお 134 名分の患者検体の多型解析を行ったが、上記 HbA1c の減少率を算出できたのは、89 名の患者であった。

5) 新規候補遺伝子探索のための、膵β細胞における SU 剤によるインスリン分泌障害モデル作製と遺伝子発現変化の解析

SU 剤は、膵β細胞に対して、短期的にはインスリン分泌を促進させるが、比較的長期に作用させた場合のβ細胞の表現型に対する詳細な影響は明らかでない。そこで、生理的なβ細胞に近いとされる、ラット INS-1D 細胞を用いて、a) 血糖降下作用は最も強力である一方、二次無効を最もきたしやすいとされるグリベンクラミド ($1\mu\text{M}$ or $10\mu\text{M}$)、b) 最も古典的な SU 剤で作用の持続はグリベンクラミドより短いトルブタミド ($100\mu\text{M}$)、c) 「第三世代」の SU 剤グリメピリド ($10\mu\text{M}$)、d) 速効型インスリン分泌促進剤レパグリニド ($1\mu\text{M}$)、でそれぞれ 16 時間処理した。

インスリン分泌量は、上記の処理を行い、洗浄後、30 分プレインキュベーションを行い、さらに各ウェルに刺激メディウムを加

えて 37°C で 60 分インキュベーションし、その上清を回収してインスリン ELISA 測定キットで測定した。刺激メEDIUM としてはグルコース 3 mM (以下 G3)、25 mM (G25) 及び KCl 30 mM (K30) を用いた。細胞は、酸エタノール溶液で処理し、インスリン含量アッセイに供した。また別途、細胞より Total RNA を抽出し、Affymetrix 社 GeneChip システム・Rat Genome 2.0 Array (約 3 万転写産物) にて遺伝子発現を網羅的に解析した。

6) 二次無効との相関解析

長期有効患者 290 名、二次無効患者 83 名、早期無効患者 16 名分の検体より、抗グルタミン酸デカルボキシラーゼ抗体陽性が疑われる患者等を除き、長期有効群 (対照群) 288 名、二次無効群 82 名、早期無効群 15 名につき、相関解析に供した。今年度解析が終了した多型は、SU 剤代謝、受容体、インスリン分泌、酸化ストレス、アポトーシス関連等の計 15 遺伝子の約 50 多型である。方法としては、昨年度より確立しているパイロシーケンシング法及び TaqMan 法によりタイピングし、その結果を相関解析に用いた。

7) ゲノム網羅的遺伝子多型解析

長期有効群 (対照群) 及び二次無効群の検体を対象に、Affymetrix 社 Gene Chip Human Mapping 250K Nsp Array を用いてゲノム網羅的遺伝子多型解析を継続した。即ち、ゲノム DNA 250 ng を制限酵素 Nsp I で処理し、アダプターをライゲーションした。アダプターを付加した DNA フラグメントを PCR 増幅後、アガロースゲル電気泳動にて 250-2000 bp のサイズのフラグメントが優先的に増幅していることを確認した。精製

した PCR 産物を定量し、その一部を DNase I で処理した。アガロースゲル電気泳動にて 180 bp 以下のサイズに断片化されたことを確認し、さらに末端標識した。標識した鋳型 DNA を含むハイブリダイゼーションカクテルを 49°C で 17 時間インキュベートして、アレイにハイブリダイズさせた。アレイを洗浄・染色後、専用スキャナーにて蛍光画像を解析した。各プローブのシグナル強度を算出し、Dynamic Model (DM) アルゴリズムにより各アレイのアレル判定率を評価し、93% 以上の場合のみ Bayesian Robust Linear Model with Mahalanobis distance classifier (BRLMM) アルゴリズムを用いてクラスタリング解析を行い、得られたジェノタイプを最終判定結果とした。

全タイピングデータは、「各多型につきアレル判定率が 90% 以上」、かつ「Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) 検定により $p > 0.00001$ 」、かつ「minor allele frequency (MAF) が 5% 以上」の 3 つの条件でフィルタリングを行い、すべてを満たす多型を相関解析に用いた。相関解析は、(1) 対立遺伝子モデル、(2) 共有性モデル、(3) 優性モデル、(4) 劣性モデルに対する χ^2 検定により評価した。

8) CYP2C19 の新規遺伝子多型の機能解析

a) 野生型及び変異型 CYP2C19 プラスミドの作製と発現

pcDNA3.1/CYP2C19*1A を鋳型にして部位特異的変異導入法により CYP2C19*1C (Ile331Val、CYP2C19.1B 蛋白をコード)、CYP2C19*18 (Arg329His / Ile331Val、同じく CYP2C19.18) 及び CYP2C19*19 (Ser51Gly / Ile331Val、同じく CYP2C19.19) cDNA を調製した。これら野生型及び変異型 CYP2C19 cDNA を pGYR I (酵母細胞発現

ベクター、酵母の P450 oxidoreductase cDNA を組み込み済)へサブクローニングした後、酵母細胞 *Saccharomyces cerevisiae* AH22 株を形質転換した。順にスケールアップし、最終的に 1.8 L の培養液から、酵母細胞を回収し、さらにマイクロソーム画分を調製した。CYP 含量 (ホロ蛋白量) は、マイクロソーム画分を用いて、還元型 CO 差スペクトルを測定して算出した。またホロ+アポ蛋白質量はイムノブロッティングにより測定した。

b) 野生型及び変異型 CYP2C19 酵素の活性測定

S-メフェニトイン 4'-水酸化活性は、Hanioka らの方法 (Drug Metab. Dispos., 30: 391-396 (2002)) に準じて測定した。また、オメプラゾール 5-水酸化活性は、Yamazaki らの方法 (J. Pharmacol. Exp. Ther., 283: 434-442 (1997)) に準じて測定した。速度論的解析は、Michaelis-Menten プロット及び Eadie-Hofstee プロットを作成し、 K_m 及び V_{max} 値を算出した。*In vitro* クリアランス値は V_{max}/K_m とした。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) SU 剤二次無効との相関解析のための臨床パネルの作製

遺伝子解析の同意を得た糖尿病患者 800 人のうち、1 型糖尿病や他疾患による 2 次

性糖尿病が否定され、薬剤内服歴を確認することのできた約 600 人について、まずゲノム収量の少なかった例を除き、次に該当する者を抽出した。結果として、二次無効群 83 名、長期有効群 (対象群) 290 名、早期無効群 16 名の臨床パネルが作製された。患者背景因子としては、BMI (Body mass index) あるいは既往最大 BMI はほぼ変わらず、「二次無効群」で必ずしもやせ型が多いわけではなかった。発症年齢もほぼ同等であった。2 親等までの糖尿病家族歴陽性率は、二次無効群で高かった。罹病期間は群間でほとんど差がなかったが、糖尿病性神経症、網膜症及び前増殖性以上の網膜症、はいずれも二次無効群、次いで早期無効群で若干高い傾向にある。一方で、腎症、虚血性心疾患はむしろ早期無効群で高く、また脳血管障害は差がなかった。

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

各遺伝子での解析結果は以下の通りである。

a) *ABCC1*: SU 剤の輸送に関与する可能性が示唆されている。31 種の新規を含む 86 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは 11 種であり、うち新規は 8 種であった。5 ブロックでハプロタイプを解析した。ブロック-1 は 5'-非翻訳領域の GCC の繰り返しより構成されており、12 種が同定された。ブロック 1, 2, 3, 4 ではそれぞれ、32 種、23 種、23 種、13 種のハプロタイプが推定された。このうち頻度約 5%以上のものは、それぞれ 5 種、6 種、5 種、6 種であった。

b) *ABCC3*: SU 剤の輸送に関与することが示唆されている。21 種の新規を含む 46 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴

うものは6種であり、うち新規は5種であった。新規のうち、2種はナンセンス変異及びフレームシフト変異であり、機能消失の可能性が示唆された。本遺伝子では、多型間の連鎖が複雑であり、区分された連鎖不平衡ブロックでのハプロタイプ解析は困難であった。

c) *NFE2L2* : 薬物動態・酸化ストレス関連遺伝子の発現誘導に関わる転写因子 Nrf2 をコードする。本遺伝子では9種の新規を含む14多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは2種であり、共に新規であった。1ブロックとしてハプロタイプを解析し、14種のハプロタイプを推定したが、このうち頻度3%以上のものは6種であり、これらを同定するためのタグ多型5種を選定した。

d) *KEAP1* : Nrf2 の発現レベルの制御に関わる細胞質蛋白質 Keap1 をコードする。本遺伝子では13種の新規を含む18多型を同定した。アミノ酸置換を伴うものは検出されなかった。1ブロックとしてハプロタイプを解析し、18種のハプロタイプを推定したが、このうち頻度3%以上のものは5種であり、これらを同定するためのタグ多型4種を選定した。

3) タイピング系の開発

昨年度同定した *HMOX1*, *IPF1*, *GPX1*, *ABCG2* の、それぞれ5, 3, 2, 9種のタグ多型及び *GCLM* の既知多型1種につき、開発したパイロシーケンシング法によるタイピングを試みたところ、解析した全ての多型及び検体 (389例、*ABCG2* のみ218例) につき明瞭なタイピング結果が得られた。また本結果は、直接シーケンス法による結果と完全に一致した。

4) 一次無効との相関解析

これまでに収集した134検体のうち、グリメピリドの投与開始後4ヶ月でのHbA1c値の減少率が算出可能であった89検体につき、*CYP2C9*, *CYP2C19*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCG2* のハプロタイプ (*ABCC3* のみ多型) との相関解析を行った。解析の結果、3種の遺伝子のハプロタイプが、HbA1c 値の減少率と有意な相関を示した。相関が認められた3種の遺伝子のハプロタイプと患者背景因子を説明変数として多変量解析を行ったところ、2種のハプロタイプが説明変数となった。この他の説明変数としては、投与開始時のHbA1c値、SU剤の投与履歴、等が挙げられる。これらを全て含んだ場合のR²値は0.663となり、比較的良好な予測モデルとなった。

5) 新規候補遺伝子探索のための、膵β細胞におけるSU剤によるインスリン分泌障害モデル作製と遺伝子発現変化の解析

本解析系において、インスリンの含量当たりの分泌量に関し、コントロール及び0.1% DMSOでは、G3に比しG25で5-6倍程度インスリン分泌が増加し、いわゆるグルコース反応性 (Glucose-stimulated insulin secretion : GSIS) がみられた。一方各SU剤処理群では、G3 (basal) の分泌にはあまり変化が見られなかったが、1μM、10μMのグリベンクラミド及びグリメピリドでは、G25の反応性が低下していた。二次無効を生じにくいトルブタミドでは、比較的GSISが保たれていた。一方レパグリニドでは若干G3 (basal) が上昇し、GSISはほとんどみられなかった。なお、high K (30mM KCl) による刺激でも分泌が若干減少しているがその障害はGSISほどではなかった。

またmRNA発現量の比較では、十分な再現性をもって変動している転写産物が比較

的によく見られた。GSIS 低下を示した 10 μ M グリベンクラミド、GSIS の低下を示さない 100 μ M トルブタミド、Basal の上昇を示す 1 μ M レパグリニドの 3 モデルで発現が変化した遺伝子を比較した。3 モデルに共通して上昇した 6 遺伝子は、たとえば SU 剤による Ca 濃度上昇による誘導、分泌されたインスリンによる誘導などのメカニズムが考えられる。10 μ M グリベンクラミドのみで変化した遺伝子は SU 剤による GSIS 障害に関連する可能性があり、二次無効への関与が示唆される。この中には、酸化ストレス防御能に関する遺伝子が含まれており、膵 β 細胞における酸化ストレス防御能の低下がグリベンクラミドによる障害に関連している可能性が考えられる。

6) 二次無効との相関解析

長期有効群（対照群）288 名及び二次無効群 82 名の間で解析多型のアリル頻度を比較した。全検体で解析が終了した 15 遺伝子の約 50 多型のうち、3 種の遺伝子の多型が有意な頻度差を示した。そこで相関が認められた 3 種の多型と患者背景因子を説明変数として多変量解析を試験的に行ったところ、2 種の多型が有意な説明変数となった。この他に有意な説明変数としては、SU 剤の開始年齢及び罹病期間が挙げられる。

7) ゲノム網羅的遺伝子多型解析

SU 剤長期有効患者 30 名、二次無効患者 19 名につき、実験を終了した。DM アルゴリズムによる平均アリル判定率は 94.78%であり、BRLMM アルゴリズムによる平均アリル判定率は 98.64%であった。解析済み検体数はまだ少ないが、以下の予備的相関解析を行った。

Nsp Array に含まれる 262,264 個の遺伝子

多型のうち、3 種のフィルタリング条件を全て満たした多型は 172,185 個であり、全多型総数の 65.7%であった。またこれらの多型は X 染色体を除き、全ての染色体に均等に分布していた。次に、対立遺伝子モデルにより SU 剤長期有効群と二次無効群間でアレル頻度の差を χ^2 検定により評価したところ、129 個の多型が $p < 0.001$ の相関を示した。最も低い p 値を示した多型は 4q に存在し、対立遺伝子モデルでは、 $p = 7.2 \times 10^{-6}$ 、 $\text{odd ratio} = 7.4$ (95% CI; 3.0-18.3) で、二次無効と相関した。

8) CYP2C19 の新規遺伝子多型の機能解析

a) 野生型及び変異型 CYP2C19 の発現

酵母細胞で発現させた野生型及び変異型 CYP2C19 ホロ+アポ酵素蛋白質の発現量は、野生型に比して CYP2C19.18 及び CYP2C19.19 では、それぞれ 171%及び 57%であった。また、還元型 CO 差スペクトルによるホロ蛋白質発現量は、CYP2C19.18 では、野生型の約 2 倍高かったのに対し、CYP2C19.19 では野生型の 65%であり、共に有意差が認められた。

b) 野生型及び変異型 CYP2C19 酵素の活性測定

野生型及び変異型 CYP2C19 の詳細な酵素化学的特性を明らかにするため、S-メフェニトイン 4'-及びオメプラゾール 5-水酸化反応の速度論的解析を行った。

S-メフェニトイン 4'-水酸化反応では、CYP2C19.19 の K_m 値は野生型 CYP2C19 と比較して約 3 倍と有意に高かったが、CYP2C19.18 では野生型 CYP2C19 との間に有意な差は見られなかった。ミクロソーム蛋白質量及び CYP 含量（ホロ蛋白質量）当たりの CYP2C19.19 の V_{max} 値は、野生型との間に有意な差はなかったが、 V_{max}/K_m 値は野

生型 CYP2C19 に比べミクロソーム蛋白量当たりでは 29%、CYP 含量当たりでは 47%と有意に低かった。一方、CYP2C19.18 の V_{max} 及び V_{max}/K_m 値は、いずれの単位においても、野生型 CYP2C19 との間に有意な差は認められなかった。

オメプラゾール 5-水酸化反応では、CYP2C19.19 の K_m 値は野生型のそれと比較して約 1.4 倍と有意に高かったが、CYP2C19.18 では野生型 CYP2C19 との間に有意な差は認められなかった。ミクロソーム蛋白量当たりの V_{max} 値及び V_{max}/K_m 値は、CYP2C19.18 及び CYP2C19.19 いずれの変異型 CYP2C19 においても野生型 CYP2C19 との間に有意な差は認められなかった。CYP 含量当たりでは、CYP2C19.19 の V_{max} 値は野生型 CYP2C19 の 1.8 倍と有意に高く、CYP2C19.18 の V_{max}/K_m は 66%まで減少した。

D. 考察

1) 一次無効関連

グリメピリドの一次無効（薬効）との関連を検討するための遺伝子多型解析は、薬物代謝酵素、薬物トランスポーター及び薬物受容体の 7 遺伝子につき、対象患者検体の多型解析が終了し、引き続き相関解析を行った。単相関解析で有意となった 3 種の遺伝子のハプロタイプは、1 種を除き機能変化がインビトロで明確に示されておらず、新規性の高いものであった。一方、多変量解析の結果、遺伝子型を説明変数として含む薬効予測モデルをほぼ確立した。しかし投与開始時の HbA1c 値等の患者背景因子の方が強く、遺伝因子の寄与は小さいものであった。これは応答変数として用いた「投与開始後 4 ヶ月での HbA1c 値の減少

率」の性質にもよると考えられるため、今後、「投与開始 4 ヶ月後の HbA1c 値」等を応答変数として用いるなど、さらなる相関解析を行う予定である。また、ABCC9 等の未解析遺伝子についても多型探索を行い、相関の有無を明らかにする。

また一次無効との相関解析の際の重要な参考データとするため、日本人で新たに見出されたアミノ酸置換を伴う 2 種類の変異型 CYP2C19 (CYP2C19.18 及び CYP2C19.19) 酵素の機能解析を行った。還元型 CO 差スペクトル測定の結果、CYP 含量（ホロ蛋白質量）は、CYP2C19.18>CYP2C19.1B>CYP2C19.19 の順であり、酵素間で大きく異なっていた。この原因は不明であるが、酵素蛋白質の転写/翻訳効率の変化、あるいは発現蛋白質の折りたたみ効率や安定性の変化等の可能性が考えられる。また酵素活性の測定では、Ser51Gly/Ile331Val 置換を伴う CYP2C19.19 の S-メフェニトイン 4'-水酸化反応の K_m 値は野生型 CYP2C19 に比べ有意に高く、ミクロソーム蛋白質量及び CYP 含量当たりの V_{max}/K_m 値は有意に低かった。従って、Ser51Gly 置換は S-メフェニトインに対する親和性を低下させ、その代謝能も低下させることが示唆された。Ser51Gly 置換はオメプラゾールに対しても親和性を低下させるが、その程度は小さく、 V_{max}/K_m 値に有意な変化は見られなかった。これらの結果から、CYP2C19*19 のアミノ酸置換による酵素機能変化は基質によって異なることが推察された。これに対し、Arg329His/Ile331Val 置換を伴う CYP2C19.18 では、若干の変化は見られたものの、両基質で野生型 CYP2C19 とほぼ同程度の活性を有していた。

2) 二次無効関連

SU 剤の二次無効に遺伝的背景が存在するか否かは諸説あり、またその発現機構も明らかにされていない。しかし、一部の患者でのみ二次無効が発現することから、何らかの個人的背景が存在すると考えられている。今回の臨床パネルにおいて、二次無効群では、糖尿病家族歴陽性率が高く、何らかの糖尿病の遺伝因子が関与している可能性が推定された。一方、罹病期間には各群間でほとんど差がなかったにもかかわらず、細小血管障害のうち特に高血糖に強く依存する、神経障害、網膜症の割合、及び進行した網膜症の割合は二次無効群で明らかに高かった。これは SU 剤からインスリン治療へ移行するまでの間、血糖コントロールが不良になりがちであった経過を反映する可能性が高く、二次無効群の管理の重要性、ひいては二次無効の早期予測の必要性が、改めて示唆された。

二次無効の発現機構としては、SU 剤による膵β細胞の機能障害及び細胞死（アポトーシス）が一因として考えられている。例えば、持続的なβ細胞の興奮（特に、持続的な細胞内 Ca 濃度上昇）によるβ細胞死、SU 剤による強制的な分泌刺激による小胞体（ER）ストレスや、酸化ストレスの関与も考えられている。一方で、SU 剤の中でも二次無効を起こしやすいものと、起こしにくいものがあるとされ、特に作用が強力かつ持続時間の長いグリベンクラミドは二次無効を生じやすく、作用時間の短いレパグリニド、ナテグリニド、比較的短いトルブタミド、あるいは抗酸化作用をもつグリクラジドは、比較的二次無効を生じにくいといわれる。今回の SU 剤障害 *in vitro* モデル系では、GSIS の低下が、特に二次無効を生じやすいグリベンクラミド群で見られ、トルブタミド群で見られなかったことから、非

常に有用なモデルが確立できたと考えられる。その解析結果から得られてきた遺伝子のなかには、酸化ストレスに関与する遺伝子のほか、従来インスリン分泌やβ細胞での機能について全く知られていなかったものも多い。今後、個別の遺伝子についてインスリン分泌への効果を検討すると共に、二次無効の候補遺伝子としての解析をより進めていく。

これらの新規候補遺伝子を含めた候補遺伝子多型解析では、15 遺伝子約 50 多型につき、対象患者全検体の解析を行い、長期有効群（対照群）及び二次無効群の間でアリル頻度を比較した。その結果、3 種の遺伝子の多型が有意な頻度差を示した。これらの遺伝子は、膵β細胞におけるインスリン分泌能及びその維持等に重要な遺伝子であり、二次無効発現との相関はある程度合理的に説明可能である。しかし、これらの多型を含めた多変量解析では、いまだ予測モデルの精度が低く、さらなる説明変数、特に強く相関する遺伝子多型の探索が必要である。今後は新規候補遺伝子探索やゲノム網羅的解析で相関が示唆された遺伝子を中心に、多型解析を行う予定である。

一方、二次無効の発現機構が不明なため、ゲノム網羅的遺伝子多型解析も行っている。今回、SU 剤長期有効患者 30 名、二次無効患者 19 名の試験的な相関解析から、129 個の多型が有意に二次無効と相関した。これらの中には、アポトーシス、インスリン分泌、糖新生に関与する蛋白質をコードする遺伝子の領域内またはその近傍に位置する多型が含まれていたが、現時点では、これらの多型の二次無効への関与を議論するのに十分な検体数には達していない。今後は、解析検体数を増やしていく予定である。さらに有意な相関を示した多型については近

傍の遺伝子部分も配列解析を行い、二次無効発現と相関の強い遺伝子領域におけるハプロタイプを同定する。

これらの解析により二次無効の予測法が確立されれば、他の薬物治療やインスリン治療に移行するなどの対策が早期に取れ、合併症の減少や患者の QOL 改善につながると期待されることから、二次無効予測モデルの確立に全力を尽くす。

E. 結論

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬につき、患者毎の遺伝子型に基づく投薬法（投薬量及び薬物選択法）を確立することを目指して研究を進めている。

一次無効との相関解析では、134 名のグリメピリド投与患者検体につき、これまでに薬効・薬物動態関連 7 遺伝子の多型同定・ハプロタイプ推定が終了した。また、*CYP2C19* で同定したアミノ酸置換を伴う新規遺伝子多型 2 種につき、*in vitro* 機能解析を行い、うち 1 種で機能低下を確認した。グリメピリドによる HbA1c 値の減少率を応答変数として相関解析を行い、単相関解析で 3 種の有意なハプロタイプを見いだした。さらに多変量解析を行い、遺伝子型を説明変数として含む薬効予測モデルをほぼ確立した。

一方、二次無効との相関解析では、二次無効群 83 例、長期有効群（対照群）290 例、早期無効群 16 例のゲノム解析用臨床パネルを作成した。二次無効群では糖尿病家族歴陽性率が高く、細小血管障害のうち特に高血糖に強く依存する神経障害、網膜症の割合が高い傾向にあり、改めて二次無効の早期予測の必要性が示唆された。また二次無効の発現機構は不明なため、*in vitro* でインスリン分泌障害モデルを確立し、二次

無効を起こしやすい薬物と起こしにくい薬物により誘導が異なる遺伝子を DNA チップで検索し、二次無効との関連が示唆される遺伝子を見いだした。候補遺伝子解析では、ハプロタイプタグ多型や機能変化が報告された多型につき、昨年度より継続して開発したタイピング系等を用いて、対象となる 389 検体につき 15 遺伝子の多型解析を行い、単相関解析で 3 種の有意な多型を見いだした。さらに多変量解析を行い、二次無効予測モデルを試作した。またゲノム網羅的遺伝子多型解析を継続し、検出多型と二次無効との関連につき、予備的解析を行った。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Maekawa, H. Fukushima-Uesaka, M. Tohkin, R. Hasegawa, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Suzuki, T. Yanagawa, Y. Saito and J. Sawada: Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of *CYP2C9* in Japanese. *Pharmacogenet. Genomics*, 16, 497-514, 2006.
- 2) K. Sai, M. Itoda, Y. Saito, K. Kurose, N. Katori, N. Kaniwa, et al. : Genetic variations and haplotype structures of the *ABCB1* gene in a Japanese population: an expanded haplotype block covering the distal promoter region, and associated ethnic differences. *Ann. Hum. Genet.*, 70, 605-622, 2006.
- 3) K. Maekawa, M. Itoda, K. Sai, Y. Saito, N. Kaniwa, K. Shirao, T. et al. : Genetic

- variations and haplotype structure of the ABC transporter gene ABCG2 in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 21, 109-121, 2006.
- 4) S. Narimatsu, R. Yonemoto, K. Saito, K. Takaya, T. Kumamoto, T. Ishikawa, ..., and N. Hanioka: Oxidative metabolism of 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (Foxy) by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1377-1385, 2006.
- 5) S. Narimatsu, F. Torigoe, Y. Tsuneto, K. Saito, N. Hanioka, et al.: Cloning of a cDNA encoding a novel marmoset CYP2C enzyme, expression in yeast cells and characterization of its enzymatic functions. *Biochem. Pharmacol.*, 72, 1738-1748, 2006.
- 6) H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, K. Maekawa, M. Saeki, N. Kamatani, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda and J. Sawada: Novel genetic variations and haplotypes of hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4A) found in Japanese type II diabetic patients. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 21, 337-346, 2006.
- 7) H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, M. Tohkin, K. Maekawa, R. Hasegawa, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Suzuki, T. Yanagawa, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda and J. Sawada: Genetic variations and haplotype structures of the ABC transporter gene ABCC1 in a Japanese population. *Drug Metab. pharmacokinet.*, 22, 48-60, 2007.
- 8) Y. Saito, K. Maekawa, S. Ozawa and J. Sawada: Genetic polymorphisms and haplotypes of major drug metabolizing enzymes in East Asians and their comparison with other ethnic populations. *Curr. Pharmacogenomics*, 5, 49-78, 2007.
- 9) H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, K. Maekawa, R. Hasegawa, K. Suzuki, T. Yanagawa, H. Kajio, N. Kuzuya, M. Noda, K. Yasuda, M. Tohkin and J. Sawada: Genetic variations of the ABC transporter gene ABCC3 in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, in press.
- 10) N. Hanioka, Y. Tsuneto, Y. Saito, T. Sumada, K. Maekawa, K. Saito, J. Sawada and S. Narimatsu: Functional characterization of two novel CYP2C19 variants (CYP2C19*18 and CYP2C19*19) found in a Japanese population. *Xenobiotica*, in press.
2. 学会発表
- 1) K. Maekawa, H. Fukushima-Uesaka, M. Tohkin, H. Kajio, K. Yasuda, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Suzuki, T. Yanagawa, Y. Saito and J. Sawada : FOUR NOVEL DEFECTIVE ALLELES AND COMPREHENSIVE HAPLOTYPE ANALYSIS OF CYP2C9 IN A JAPANESE POPULATION. 第 16 回ミクロソームと薬物酸化に関する国際シンポジウム (平成 18 年 9 月、ハンガリー、ブダペスト)
- 2) 辻さや香、岩部寛之、山本真紀、竹田友理、鳥越史宙、埴岡伸光、成松鎮雄：酵母発現ベクター-pYES を用いた CYP-fp2 共発現系の構築。第 45 回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (平成 18 年 10 月、広島)
- 3) 齋藤啓太、山野茂、増田和文、勝孝、埴岡伸光、成松鎮雄：CYP2C19 の薬物酸化反応に関与する Glu-300 の役割。日本薬物動態学会第 21 回年会 (平成 18 年 11 月、東京)
- 4) 経遠祐美、埴岡伸光、齋藤嘉朗、角田知子、前川京子、齋藤啓太、澤田純一、成

- 松 鎮雄：日本人で新たに見出された CYP2C19 (CYP2C19*18 及び CYP2C19*19) の機能解析。日本薬物動態学会第 21 回年会 (平成 18 年 11 月、東京)
- 5) 前川京子、福島 (上坂) 浩美、頭金正博、長谷川隆一、梶尾 裕、葛谷信明、安田和基、川本学、鎌谷直之、鈴木佳寿子、柳川達生、斎藤嘉朗、澤田純一：日本人における薬物代謝酵素 CYP2C9 の新規遺伝子多型の機能解析。日本薬物動態学会第 21 回年会 (平成 18 年 11 月、東京)
- 5) Y. Saito, H. Fukushima-Uesaka, M. Tohkin, K. Maekawa, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda and J. Sawada: HAPLOTYPE STRUCTURES AND TAGGING GENETIC VARIATIONS OF AN ABC TRANSPORTER ABCC1 IN A JAPANESE POPULATION. 日本薬物動態学会第 21 回年会 (平成 18 年 11 月、東京)
- 6) 斎藤嘉朗、福島 (上坂) 浩美、前川京子、・・・梶尾裕、葛谷信明、野田光彦、安田和基、澤田純一：日本人における酸化ストレス関連遺伝子の遺伝子多型探索及びハプロタイプ解析。日本分子生物学会 2006 フォーラム (平成 18 年 12 月、名古屋)
- 7) 斎藤嘉朗、福島 (上坂) 浩美、前川京子、長谷川隆一、梶尾裕、葛谷信明、野田光彦、安田和基、鈴木佳寿子、柳川達生、頭金正博、澤田純一：日本人における薬物トランスポータ ABCC3 の遺伝子多型探索。日本薬学会第 127 年会 (平成 19 年 3 月、富山)

二次無効発現と相関する遺伝子多型につき、特許出願を予定している。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

II. 分担研究報告

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

分担研究者 安田 和基（国立国際医療センター研究所 代謝疾患研究部長）

研究要旨

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬で繁用されているスルホニルウレア剤（SU 剤）の二次無効の遺伝子解析のために、「SU 剤二次無効群」83 例、「早期無効群」16 例と、「対照群」290 例のゲノム解析用パネルを作成した。次に「二次無効」の分子メカニズムを解析するために、Glibenclamide、Tolbutamide、Repaglinide、Glimepiride のそれぞれを含む培地で、INS-1D 細胞を 72 時間培養し、in vitro の障害モデルを構築した。GeneChip システムで網羅的な遺伝子発現解析を行い、特に Glibenclamide によるインスリン分泌障害モデルに特異的と思われる遺伝子変化など、興味深い候補をいくつか得ている。

A. 研究目的

スルホニルウレア剤（以下、SU 剤）は糖尿病の経口治療において最も頻繁に使用される薬剤であるが、当初から SU 剤が効かずインスリン治療に移行する、いわゆる「一次無効」と呼ばれる症例がある割合で見られる。また、「二次無効」、すなわち治療効果を発揮した SU 剤が一定期間経過した後臨床的に効かなくなり、インスリン治療へ移行する、という現象は、糖尿病の診療において頻繁にみられるばかりでなく、血糖コントロールの悪化や QOL の低下を招くなど、臨床的に最も重要な事象の 1 つである。しかしながら、その定義は一定でなく、その本体も膵β細胞の「疲弊」などと表現されることもあるが、分子メカニズムは明らかでない。

ここでは、「一次無効」「二次無効」のそれぞれの遺伝子解析に寄与する臨床パネルを作成する。また、「二次無効」の進展において、SU 剤自体が膵β細胞障害の進展に

寄与するのではないか、という仮説をたて、そこに寄与する分子及び遺伝因子の解明を目的とする。

B. 研究方法

- (1) グリメピリド投与検体の臨床パネル（一次無効及び副作用解析用）
平成 17 年度に報告したので省略する。
- (2) 「SU 剤二次無効」解析のための臨床パネル

「SU 剤二次無効」の遺伝子解析のための臨床パネルを作成した。「二次無効」の厳密な定義は存在しないが、臨床的な視点から、A. 「一定期間 SU 剤を使用し」、かつ B. 「その後インスリン治療へ移行した」患者群を対象とした。A. については、SU 剤開始後早期にインスリン治療へ移行した者は、slowly progressive IDDM のように 1 型に近い病態、あるいは MODY などが含まれる可能性がある。従って、

これらを除外するため「3年以上」とした。SU剤であることが確認できれば、使用したSU剤の種類については、ここでは問わなかった。

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

さらに今回は、E「SU剤使用期間が一定の長さに満たずに」かつB「インスリン治療に移行した」群を設定し「早期無効群」と称した。

(3) 膵β細胞におけるSU剤による分泌障害モデル

①SU剤による障害モデルの作成

SU剤は、膵β細胞に対して、短期的にはK-ATPチャネルの閉鎖を通じてインスリン分泌を促進するが、比較的長期に作用させた場合、β細胞の表現型にどのような変化をもたらすかについては、詳細は明らかでない。そこで、生理的なβ細胞に近いとされる、ラットINS-1D細胞を用いて、以下の薬剤をそれぞれ16hr作用させた後、インスリン分泌反応を検討した。用いたSU剤は、臨床的に血糖降下作用は最も強力である一方、二次無効を最もきたしやすいとされるGlibenclamide、最も古典的なSU剤の一つで作用の持続はGlibenclamideよりは短いTolbutamide、いわゆる「第三世代」のSU剤Glimepiride、いわゆる速効型インスリン分泌促進剤Repaglinideである。

既報の文献をいろいろ検討した上で、各薬剤を10%FCS存在下で以下の濃度で培地に添加し、16時間インキュベートした。

- 100 μM Tolbutamide

- 1 μM or 10 μM Glibenclamide
- 1 μM Repaglinide
- 10 μM Glimepiride

いずれも、DMSO溶解液で1000倍濃度のストックを作成して添加しているため、コントロールも0.1%DMSO加培地とした。

インスリン分泌反応は、24穴プレート(CellBind)を用い、バッチインキュベーション法にて行った。具体的には上記薬剤を含む培地で16hrインキュベートした後、培地交換、PBSによる洗浄の後、KRH溶液により30分プレインキュベーションを行い、各ウェル500 μlの刺激メディウムを加えて37°Cで60分インキュベーションし、上清を回収してインスリンELISA測定キット(シバヤギ)でduplicateにて測定した。刺激メディウムとして具体的にはグルコース3mM(以下G3)、25mM(G25)及びKCl 30mM(K30)を用いた。上清を完全に除いた後、酸エタノール溶液を細胞に加え、-20°Cで24hr静置した後回収し、インスリン含量アッセイに供した。

②SU剤障害モデルにおける遺伝子発現変化の解析

細胞を培養させて前記と同様のモデルを作成し、6 cm dishにてQiagen社RNeasyキットを用いてTotal RNAを抽出した後、Affymetrix社GeneChipシステム・Rat Genome 2.0 Array(約3万転写産物)にて遺伝子発現を網羅的に解析した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

(1) 「SU 剤二次無効」解析のための臨床パネル

① 遺伝子解析の同意を得た糖尿病患者 800 人のうち、1 型糖尿病や他疾患による 2 次性糖尿病が否定され、薬剤内服歴を確認することのできた約 600 人について、まずゲノム収量の少なかった例を除き、次に前述の項目に該当する者を抽出した。

- ・「A 及び B」を満たす者（二次無効群）：83 名
- ・「C 及び D」を満たす者（対象群）：290 名
- ・「E 及び B」を満たす者（早期無効群）：16 名

これらを候補遺伝子多型解析及び、ゲノムワイド多型解析などに供するため、ゲノム DNA 5 μ g を主任研究者斎藤嘉朗先生のもとへ送っている。

② パネルの臨床背景

「A 及び B」（二次無効群）と「C 及び D」（対象群）「E 及び B」（早期無効群）について、糖尿病に関する臨床情報をまとめた（表 1）。BMI (Body mass index) あるいは既往最大 BMI はほぼ変わらず、「二次無効群」で必ずしもやせ型が多いわけではなかった。発症年齢もほぼ同等であった。2 親等までの糖尿病家族歴陽性率は、二次無効群で高かった (60.2% vs 54.5% vs 43.8%, 二次無効 vs 対象 vs 早期無効、以下同じ)。罹病期間は群間で全く差がなかったが、糖尿病性神経症 (49.4% vs 23.4% vs 25.0%)、網膜症 (63.9% vs 30.0% vs 50.0%) 及び前増殖性以上の網膜症 (51.8% vs 19.7% vs 43.8%)、はいずれも二次無効群、次いで早期無効群で若干高い傾向にある。一方で、腎症 (37.3% vs 27.6% vs 50.0%)、虚血性心疾患 (25.3% vs 18.6% vs 43.6%) はむしろ早

期無効群で高く、また脳血管障害 (7.2% vs 9.0% vs 6.3%) は差がなかった。

(2) 膵 β 細胞における SU 剤による遺伝子発現変化

① 各薬剤の 16hr 刺激によるインスリン分泌の変化

100 μ M Tolbutamide、1 μ M or 10 μ M Glibenclamide、10 μ M Glimpiride、1 μ M Repaglinide を含む RPMI 培地で INS-1D 細胞をそれぞれ 16hr 培養し、対照として 0.1% DMSO を加えた培地で培養した細胞と、インスリン分泌反応を比較した (図 1)。

インスリンの含量あたりの分泌をみると、Control 及び 0.1% DMSO では、G3 に比し G25 で 5~6 倍程度インスリン分泌が増加し、いわゆるグルコース反応性 (Glucose-induced insulin secretion: GSIS) がみられた。SU 剤で 16hr インキュベートした各群は、インスリン含量が低下している傾向があったが、これは分泌刺激が持続したためと思われる。

インスリン含量あたりの分泌をみると、各 SU 剤群で G3 (basal) の分泌はほぼ同等だったが、1 μ M、10 μ M の Glibenclamide 及び Glimpiride で G25 の反応性が低下していた。二次無効を生じにくい Tolbutamide では、比較的 GSIS が保たれていた。一方 Repaglinide では若干 G3 (basal) が上昇し、GSIS はほとんどみられなかった。なお、high K (30mM KCl) による刺激でも分泌が若干低下しているがその障害は GSIS ほどではなかった。

② 各薬剤の 16hr 刺激による遺伝子発現変化

これらで、対照に比べて有意に変動していた遺伝子 (転写産物) の数を表 2 に示す。

昨年度のモデルに比べると、このうち、 $n=2$ で十分再現性をもって変動している転写産物は比較的多く見られた。

次に薬剤同士を比較した。図 2 に、GSIS 低下を示した $10\ \mu\text{M}$ Glibenclamide、GSIS の低下を示さない $100\ \mu\text{M}$ Tolbutamide、Basal の上昇を示す $1\ \mu\text{M}$ Repaglinide の 3 モデルで発現が変化した遺伝子の比較を示す。

Rat Genome アレイは、アノテーションの確定していない遺伝子産物や EST が多く、機能的にも必ずしも一定の傾向はみられていないが、いくつか興味深い遺伝子も散見される。3 モデルに共通して上昇した 6 遺伝子は、たとえば SU 剤による Ca 濃度上昇による誘導、分泌されたインスリンによる誘導などのメカニズムが考えられる。 $10\ \mu\text{M}$ Glibenclamide のみで変化した遺伝子は SU 剤による GSIS 障害に関連がある可能性があり、二次無効に関与する分子の有望なリストである。興味深いのはこのなかに、酸化ストレス防御能に関する遺伝子が含まれていたことで、膵 β 細胞における酸化ストレス防御能の低下が Glibenclamide による障害に関連している可能性が考えられる。一方、 $100\ \mu\text{M}$ Tolbutamide で上昇するが、 $10\ \mu\text{M}$ Glibenclamide で上昇しなかった遺伝子は、あるいは GSIS に有利にはたらく可能性もあるかもしれない。

D. 考察

SU 剤の二次無効に至る遺伝的背景があるかどうか、またそれが 2 型糖尿病の遺伝因子と共通か独立かどうかについては、疫学的研究も含めてこれまで報告がない。しかしながら、必ずしもすべての患者で二次無効が生じるわけではなく、長期にわたって SU 剤が有効な症例も少なくないことか

ら、二次無効に至る個人にはなんらかの背景が存在するのではないかと、というのが、糖尿病臨床医が抱く印象であった。

昨年度に引き続き SU 剤使用歴まで確認しえた約 600 症例から、「二次無効群」と「対照群」を選択し、さらに「早期無効群」を加えてその臨床像を解析した。「二次無効群」は、糖尿病家族歴陽性率（二次無効そのものの家族歴ではないものの）は高く、やはり糖尿病の遺伝因子のいくつかに関与している可能性もあると思われる。一方で、罹病期間に各群で差がなかったにもかかわらず、細小血管障害のうち特に高血糖に強く依存する、神経障害、網膜症の割合、及び進行した網膜症の割合は「二次無効群」で明らかに高い。これらは病的に二次無効と共通する可能性もあるが、むしろ SU 剤からインスリン治療へ移行するまでの間、血糖コントロールが不良になりがちであった経過を反映する可能性が高く、「二次無効群」の管理の重要性、ひいては二次無効の早期予測の必要性が、改めて示唆されたと考えられる。一方細小血管障害の中でも腎症や、虚血性心疾患・脳血管障害のような動脈硬化性疾患の合併率は異なる傾向を示したが、血糖コントロール以外の要因も大きいとされているためかもしれない。

SU 剤が効かなくなる主な原因として、さまざまな原因が考えられ（図 3）、臨床的な「二次無効」も非常に不均一な病態と考えられる。しかし今回、臨床的に「二次無効」の病像をとる可能性がある若年発症例については、ミトコンドリア異常や、MODY (maturity onset diabetes of the young) などの単一遺伝子タイプを遺伝子検索により除外し、抗 GAD 抗体陽性のいわゆる SPIDDM (あるいは、「1.5 型」糖尿病) も