

除いている。

一方、病態として、依然として議論があり、かつ臨床的に治療方針の選択の上で重要なのは、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）、などの場合であり、これを真の「二次無効」と呼ぶべきかと思われる。その原因として、一般の「薬剤耐性」とは異なり、SU 剤による作用そのものが原因という考え方が注目されている。たとえば、持続的なβ細胞の興奮が持続的な細胞内 Ca 濃度上昇をきたし、これがインスリン分泌抑制、さらにはβ細胞死を引き起こす、という説、また 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想定されている。一方で、SU 剤の中でも二次無効を起こし易いものと、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 Glibenclamide は二次無効を生じやすく、作用時間の短い Repaglinide、Nateglinide、比較的短い Tolbutamide、あるいは抗酸化作用をもつ Gliclazide 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、培地に含まれる FBS（仔ウシ血清）などから、薬物の真の濃度は確定できないが、各薬剤の濃度は過去の文献に用いられた濃度のうち、アポトーシスをきたす濃度よりやや低目に設定した。実際、細胞数の明らかな減少は認めなかった。また GSIS の低下が、特に二次無効を生じやすい Glibenclamide 群でみられ Tolbutamide 群でみられなかったこと、平成 17 年度のモデルに比べマイクロアレイの結果も安定していることなどから、非常に有用なモデルが作成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興味深

い遺伝子のほか、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 siRNA を用いたノックダウンなどでインスリン分泌への効果をみると共に、二次無効の候補遺伝子としての解析を進めてゆきたい。またこれらは、主任研究者の行っているゲノムワイド多型解析において、陽性となった多型部位のゲノム上の位置から真に二次無効に関与する遺伝因子を探索する際、絞り込みを行うための有用な分子リストとなりうると考えられる。

E. 結論

ゲノムワイドおよび候補遺伝子による「SU 剤二次無効」の解析に有用と考えられるパネルを作成した。また「二次無効」の分子メカニズムを解析するための *in vitro* モデル系を確立し、網羅的発現解析を試み、興味深い遺伝子を多数得た。平成 19 年度、得られた分子の機能的・遺伝学的意義を検討してゆく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Hasegawa R, Suzuki K, Yanagawa T, Kajio H, Kuzuya N, Noda M, Yasuda K, Tohkin M, Sawada J. Genetic Variations of the ABC Transporter Gene *ABCC3* in a Japanese Population. *Drug Metab Pharmacokinet.* in press.

2) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Tohkin

M, Maekawa K, Hasegawa R, Kawamoto M, Kamatani N, Suzuki K, Yanagawa T, Kajio H, Kuzuya N, Yasuda K, Sawada J. Genetic Variations and Haplotype Structures of the ABC Transporter Gene *ABCC1* in a Japanese Population. *Drug Metab Pharmacokinet.* 22 (1):48-60, 2007.

3) Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Saeki M, Kamatani N, Kajio H, Kuzuya N, Yasuda K, Sawada J. Novel genetic variations and haplotypes of hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4A) found in Japanese type II diabetic patients. *Drug Metab Pharmacokinet.* 21 (4):337-46, 2006.

4) Maekawa K, Fukushima-Uesaka H, Tohkin M, Hasegawa R, Kajio H, Kuzuya

N, Yausda K, Kawaoto M, Kamatani N, Suzuki K, Yanagawa T, Saito Y, Sawada J. Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of *CYP2C9* in Japanese. *Pharmacogenet. Genomics* 16 (7):497-514, 2006.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特になし。

表1:SU剤二次無効解析用臨床パネル

	二次無効群(B-1+B-2)	対照群(A-1+A-2)	早期無効群(C)
n	83	290	16
SU剤使用歴	11.0±6.96 (2~31年)	12.0±6.79 (5~37年)	1.00±0.73 (0~2年)
年齢	70.4±9.28	70.6±9.21	67.3±10.66
性別	男 47 女 36	男 180 女 110	男 12 女 4
罹病期間	24.4±9.64	20.2±10.43	21.3±5.31
HbA1c	8.7±1.77	7.3±1.20	7.7±1.22
FBS	174.7±60.03	147.5±40.30	142.6±12.25
BMI	23.4±3.07	23.3±3.38	22.7±2.92
Max BMI	27.1±4.07	26.8±3.99	27.3±3.96
家族歴あり	50/83 (60.2%)	158/290 (54.5%)	7/16 (43.8%)
神経症あり	41/83 (49.4%)	68/290 (23.4%)	4/16 (25.0%)
網膜症あり	53/83 (63.9%)	87/290 (30.0%)	8/16 (50.0%)
(同A2以上)	43/83 (51.8%)	57/290 (19.7%)	7/16 (43.8%)
腎症あり	31/83 (37.3%)	80/290 (27.6%)	8/16 (50.0%)
(同Cr2以上)	2/83 (2.4%)	2/290 (0.7%)	0/16 (0%)
心疾患あり	21/83 (25.3%)	54/290 (18.6%)	7/16 (43.8%)
脳血管障害あり	6/83 (7.2%)	26/290 (9.0%)	1/16 (6.3%)

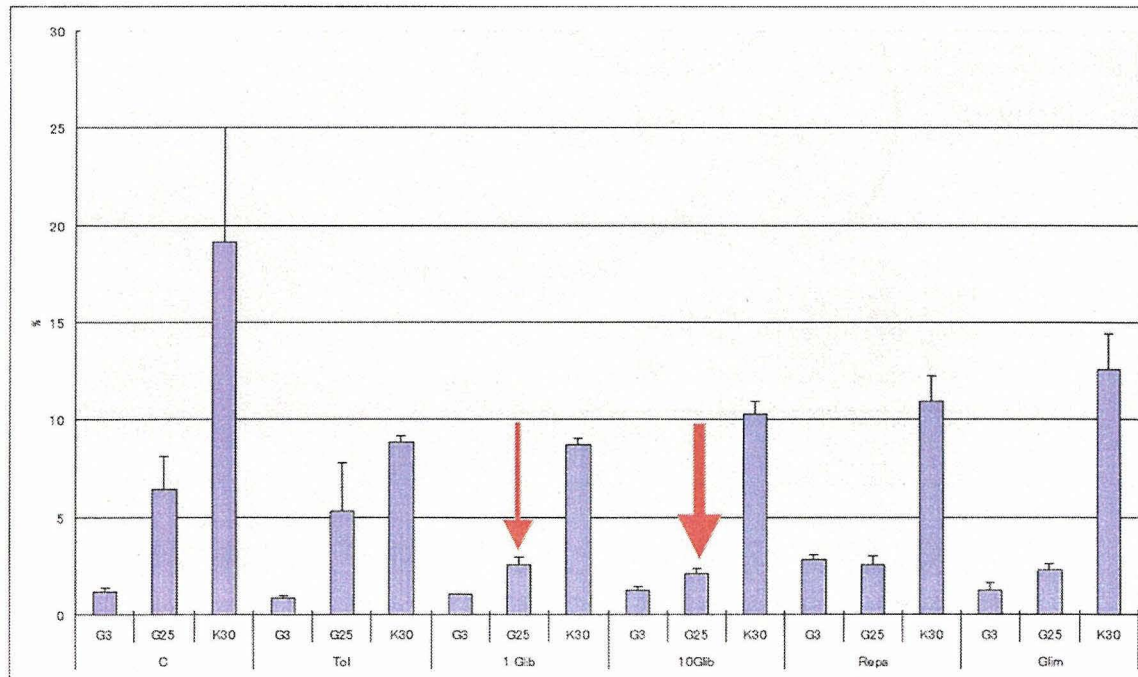


図1:SU 剤処理によるインスリン分泌障害モデル(含量あたり%)

C: 0.1% DMSO; Tol: 100 μ M Tolbutamide; 1 Glib: 1 μ M Glibenclamide; 10 Glib: 10 μ M Glibenclamide; Repa: 1 μ M Repaglinide; Glim: 10 μ M Glimperiride.

表2: SU剤刺激(16時間)で発現が変動した遺伝子数

	増加	減少
1uMGlibenclamide	60	6
10uMGlibenclamide	25	4
100uMTolbutamide	35	9
1uMRepaglinide	21	12
10uMGlimepiride	28	7

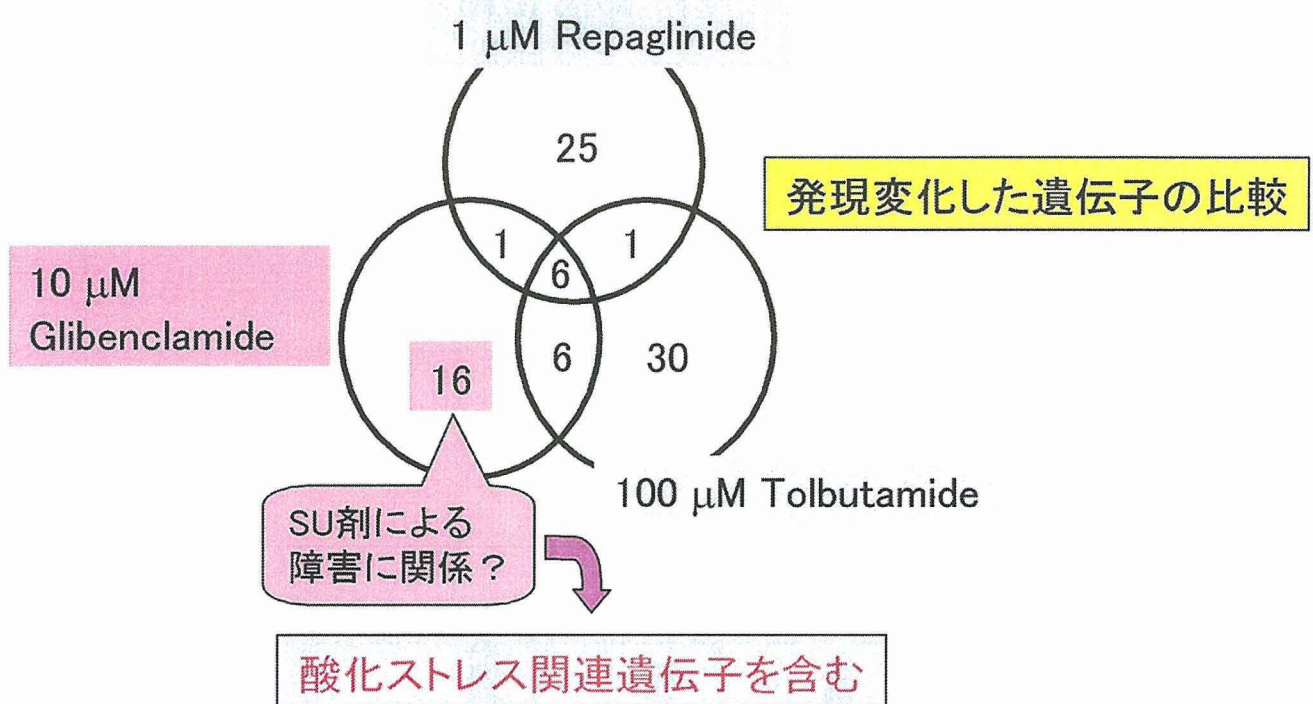


図2: SU剤によるインスリン分泌不モデルの作成と、発現解析による候補遺伝子探索

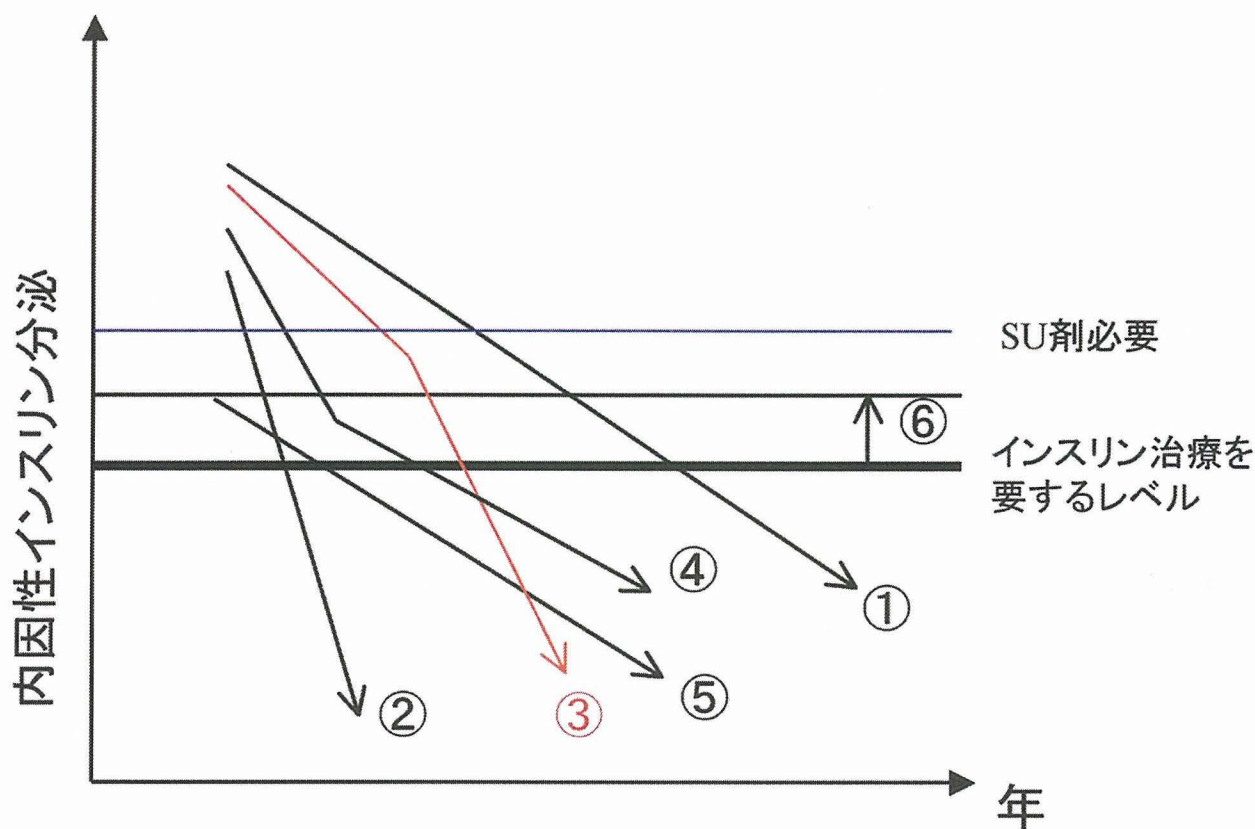


図3:SU剤「二次無効」のモデル

- ①経時的に分泌低下(一般の糖尿病、「代償機構」の破綻)
- ②既知の原因で急速に分泌低下(MODY、膵島破壊など)
- ③SU剤使用で急速に低下
- ④長期の放置歴あり
- ⑤当初から分泌不全(β 細胞低形成など「一次無効」?)
- ⑥インスリン抵抗性(環境因子)

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

分担研究者 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（SU 剤）の一次無効との相関解析のため、昨年度に継続して、薬物動態関連分子 *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCG2* の遺伝子多型を SU 剤グリメピリド投与患者において同定し、さらにハプロタイプを推定した。昨年度分と合わせて、計 7 遺伝子のハプロタイプ等とグリメピリドによる HbA1c 値の減少率との相関解析を行い、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。また SU 剤の二次無効との相関解析では、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、二次無効群 83 例、長期有効群（対照群）290 例、早期無効群 16 例につき 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。

A. 研究目的

本邦の糖尿病患者は約900万人に達する。糖尿病は治癒することではなく、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が、相関する遺伝子多型の報告は極めて少ない。

本分担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を目指して、候補遺伝子多型解析を行い、他の分担研究者の結果と合わせて、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。

今年度は、一次無効との相関解析のために、第 3 世代の SU 剤であるグリメピリドを投与された患者検体につき、その体内動態に關与する薬物トランスポーター *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCG2* の遺伝子多型解析を行った。さらに昨年度報告した *CYP2C9*, *CYP2C19*, *ABCC8*, *KCNJ11* の遺伝子多型解析結果も含めて、臨床情報との相関解析を行った。また二次無効発現との相関解析のために、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 *NFE2L2* 及び *KEAP1* 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。

B. 研究方法

1) 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（約 50-100 ng）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。即ち、複数の約 3-16 kb の領域につき、Z-Taq DNA polymerase（宝バイオ㈱、滋賀）を用いて増幅反応を行った。PCR 反応は 98°C で 5 秒、55°C で 5 秒、及び 72°C で 190 秒を 30 サイクル行った。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。即ち、第 1 段目の PCR 産物を一部用いて、Ex-Taq DNA polymerase（宝バイオ㈱）により増幅反応を行った。但し、一部の領域は GC 含量が高いため、LA-Taq DNA polymerase 及び GC buffer I または GC buffer II（宝バイオ㈱）を用いて増幅した。PCR 反応は 94°C で 5 分処理後、94°C で 30 秒、55°C（*ABCC1*）または 60°C（*ABCC3*, *NFE2L2*, *KEAP1*）で 1 分、及び 72°C で 2 分を 30 サイクル行い、最後に 72°C で 7 分処理した。PCR 産物を PCR Product Pre-Sequencing Kit（USB Co.,

Cleveland, OH, USA）にて処理した後、ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）を用いたサイクルシーケンシング反応を行った。反応液を DyeEx96 Kit（Qiagen, Hilden, Germany）にて処理し過剰の塩基等を除いた後、ABI Prism 3730 DNA Analyzer（Applied Biosystems）にて配列を解析した。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。

連鎖不平衡解析はソフトウェア SNPalyze（Dynacom, Yokohama, Japan）により行い、 $|D'|$ 値および r^2 値で連鎖の強さを評価した。解析の結果を視覚的に表示するため、 $|D'|$ 値および r^2 値の大きさ（0~1）を 10 段階の青色の濃さで表すマクロを MS Excel を用いて開発したものを使用した。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。

2) タイピング系の開発

昨年度の *TNFAIP3*, *IAPP* に引き続き、*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%以上のハプロタイプのタグとなる多型とした。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ゲノム DNA（約 25 ng）より Ex-Taq DNA polymerase（*GCLM*, *ABCG2*）または LA-Taq DNA polymerase 及び GC buffer I（*HMOX1*, *IPF1*, *GPX1*）を用いて特異的に増幅した。この際、それぞれのプライマーのいずれか一方は、ビオチンラベルしたものをを用いた。PCR 条件は

94°Cで5分処理後、94°Cで30秒、55°Cで45秒、72°Cで30秒を50サイクル行い、最後に72°Cで5分処理した。PCR産物を0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.05% Tween 20を含む5 mM Tris-HCl (pH 7.6) 中でStreptavidin-Sepharose High Performance (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) と10分インキュベートして結合させ、MultiScreen-HV Plate (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)に移した。0.2 M NaOHを添加して1分間処理することにより1本鎖化し、さらに洗浄後、2 mM Mg-acetateを含む20 mM Tris-acetate (pH 7.6)中でビーズを懸濁し、96-well PSQ plate (Biotage AB, Uppsala, Sweden)に移した。シーケンシングプライマーを10 pmol分加え、95°Cで2分間処理した後、室温まで冷却し、シーケンシングプライマーとPCR産物をハイブリダイズさせた。これをPSQ™96MA (Biotage AB)及びPSQ 96 SNP Reagent Kit (Biotage AB)を用いてミニシーケンシング反応を行い、多型を解析した。

3) TaqMan 法による遺伝子多型タイピング

二次無効との相関解析のため、TaqMan SNP Genotyping Assay Kit (Applied Biosystems)を用いたタイピングを、SU剤の二次無効群、長期有効群(対象群)及び早期無効群のゲノムDNA計389検体につき行った。対象は*IRSI*, *WFS1*, *CYP2C9*, *ABCC8*, *KCNJ11*等の7種の遺伝子の既知多型約25種で、添付のマニュアル通り行い解析した。

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*(頻度約5%以上のハプロタイプタグ多型)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名の患者であり、その患者背景因子のまとめを表1に示した。また統計解析は、Kruskal-Wallis検定、Dunns検定、Mann-Whitney U検定はPrism ver. 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)で、多変量解析はJMP ver. 6.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA)により行った。

5) 二次無効との相関解析

二次無効については、長期有効患者(対照群:5年以上SU剤を使用し、インスリン治療に移行していない)290名、二次無効患者(3年以上SU剤を使用し、現在はインスリン治療に移行)83名、早期無効患者(SU剤開始後、3年未満でインスリン治療に移行)16名分の検体が分担研究者の安田和基部長より供与された。このうち、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、*CYP2C9*, *ABCC8*, *IAPP*, *WFS1*, *IRSI*, *IPF1*, *GCLM*, *HMOX1*, *TNFAIP3*等の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

タイプングした。また統計解析は、 χ^2 検定、Fisher の正確確率検定は Prism ver. 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)で、多変量解析は JMP ver. 6.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) により行った。

(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) 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

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。活性低下を伴う既知の多型 (*Arg723Gln*) の頻度は 0.07 であった。本多型情報を用いて連鎖不平衡解析を行ったところ、本遺伝子は 5 ブロックでハプロタイプを解析することが妥当と考えられた。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 種の繰り返し構造が同定された。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 5 種のうち、2 種はナンセンス変異 (*Gln741Stop*) 及びフレームシフト変異 (*Gln933ArgfsX64*) であり、17 個の膜貫通ドメインのうち N 末から 12-17 番目と 17 番目より後の細胞質ドメイン (輸送活性に重要な ATP 結合部位を含む) を失うため、機能は消失する可能性が考えられた。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、困難であると考えられた。

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。本多型情報を用いて連鎖不平衡解析を行ったところ、強い連鎖が解析領域全体で認められたため、1 ブロックとしてハプロタイプ解析を行った。その結果、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 (5% 以上のものは 4 種) であった。本結果に基づき 6 種のコモンハプロタイプ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。本多型情報を用いて連鎖不平衡解析を行ったところ、強い連鎖が解析領域全体で認められたため、1 ブロックとしてハプロタイプ解析を行った。その結果、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 (5%以上のものは 3 種) であった。本結果に基づき 5 種のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型 4 種を選定した。

2) 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、数検体につき直接シーケンス法を行い、その結果を本パイロシーケンシング法による結果と比較したところ、完全に一致した。

3) TaqMan 法による遺伝子多型タイピング

7 種の遺伝子の既知多型約 25 種 (主として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、TaqMan 法によるタイピングを行い、解析した全ての多型及び検体 (389 例) につき明瞭なタイピング結果が得られた。

4) 一次無効との相関解析

グリメピリドの投与開始後 4 ヶ月での HbA1c 値の減少率と *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。その結果の 1 例を図 1A に示した。このハプロタイプは複数の多型部位と連鎖が見られる多型のみを有しているが、本多型自体では HbA1c 値の減

少率と有意な相関を示さない (図 1B) ことから、ハプロタイプ解析の重要性が改めて示唆された。

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 R^2 値は 0.663 となり、比較的良い予測モデルとなった。

5) 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レル頻度を比較した。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 (表 2)。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。しかしこの二次無効発現予測モデルの R^2 値は 0.118 とまだ小さく、さらなる説明変数、特に相関する遺伝子多型の探索が必要である。

D. 考察

グリメピリドの一次無効 (薬効) との相関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り

ず、新規性の高いものであった。また 1 種は、多型自体では HbA1c 値の減少率と有意な相関を示さないことから、ハプロタイプ解析の重要性が改めて示唆された。一方、多変量解析の結果、2 種のハプロタイプが説明変数として残ったものの、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。

二次無効との相関解析では、15 遺伝子約 50 多型につき対象患者検体の解析を行い、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。

今後は解析対象遺伝子を増やして、未解析である *HNF4A*、*ABCA1*、*IRS2*、*NQO1* 等の解析を行う予定である。また分担研究者・安田和基部長のインスリン分泌障害モデルにおいてグリベンクラミドのみで発現変化が見られた遺伝子の未解析分、及び分担研究者・前川京子主任研究官の網羅的遺伝子多型解析で有意な相関が見られた多型の周辺領域の解析をあわせて行う。その際は、HapMap プロジェクト等のデータを活

用する予定である。これらの解析から、二次無効発現と相関する多型をより多く見いだして、二次無効予測モデルの精度を上げることに全力を尽くす所存である。

E. 結論

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（SU 剤）の一次無効との相関解析のため、昨年度に継続して、薬物動態関連分子 *ABCC1*、*ABCC3*、*ABCG2* の遺伝子多型を SU 剤グリメピリド投与患者において同定し、さらにハプロタイプを推定した。昨年度分と合わせて、計 7 遺伝子のハプロタイプ等とグリメピリドによる HbA1c 値の減少率との相関解析を行い、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。また SU 剤の二次無効との相関解析では、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プング系等を用いて、二次無効群 83 例、長期有効群（対照群）290 例、早期無効群 16 例につき 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。

謝辞

協力研究者の国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部・部長・澤田純一博士、同・医薬安全科学部・室長・頭金正博博士、同・代謝生化学部・主任研究官・佐井君江博士に感謝申し上げます。

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) 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.
- 5) 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.

- 6) 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, 2007.

2. 学会発表

- 1) 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 30 日、東京)
- 2) 斎藤嘉朗、福島 (上坂) 浩実、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 6 日、名古屋)
- 3) 斎藤嘉朗、福島 (上坂) 浩実、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 28 日、富山)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

表1. グリメピリドによる HbA1c 値の減少率との相関解析用臨床パネル

患者背景因子のまとめ (平均値±SD)	
n	89
年齢 (歳)	64.6 ± 10.5 (Max: 85, Min: 38)
性別	Male: 41, Female: 44 (No data: 4)
BMI	24.1 ± 3.6 (Max: 37.3, Min: 16.6)
糖尿病歴 (年)	10.7 ± 8.42 (Max: 36, Min: 0.5)
開始投与量 (mg)	1.44 ± 0.94 (Max: 6, Min: 0.5)
HbA1c 値 (0 ヶ月)	8.90 ± 1.52 (Max: 15.0, Min: 6.7)
HbA1c 値 (4 ヶ月)	7.44 ± 1.30 (Max: 11.2, Min: 5.2)
HbA1c 値減少率 (0 - 4 ヶ月, %)	14.7 ± 16.8 (Max: 54.0, Min: -25.8)
FBS 値 (0 ヶ月)	218.5 ± 90.6 (Max: 591, Min: 97)
FBS 値 (4 ヶ月)	169.6 ± 52.6 (Max: 336, Min: 87)
FBS 値減少率 (0 - 4 ヶ月, %)	13.7 ± 35.3 (Max: 82.6 Min: -141.7)
SU 剤投与歴有り	48/89 (53.9%)
クレアチニン値	0.73 ± 0.22 (Max: 1.3, Min: 0.4)
BUN 値	16.0 ± 5.42 (Max: 39, Min: 9)
GOT 値	26.1 ± 20.9 (Max: 147, Min: 10)
GPT 値	29.5 ± 21.3 (Max: 133, Min: 9)
総コレステロール値	207.4 ± 40.4 (Max: 362, Min: 128)
HDL コレステロール値	51.2 ± 13.6 (Max: 83, Min: 31)
中性脂肪値	180.7 ± 172.0 (Max: 1440, Min: 41)

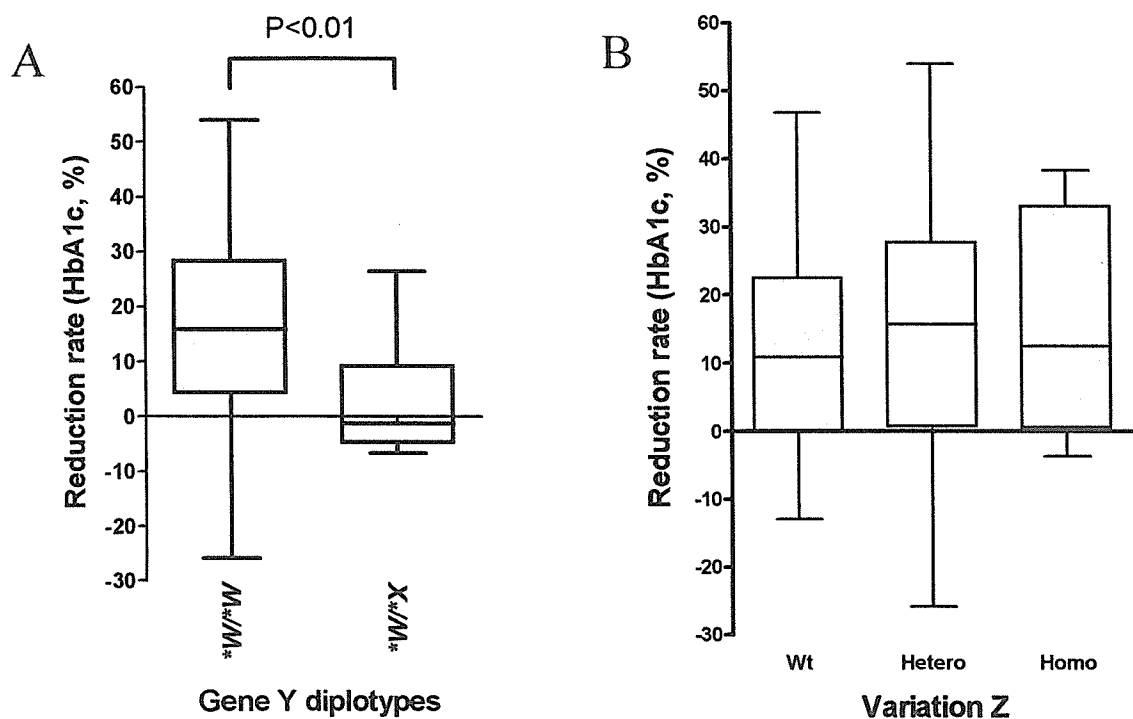


図1. HbA1c 値の減少率と有意な相関を示したハプロタイプの例 (A) とそのハプロタイプを構成する遺伝子多型部位のみの結果 (B)。多型部位のみでは有意な相関は得られなかった。Wt, Wild-type; Hetero, Heterozygote; Homo, Homozygote.

表2. 多変量解析 (ロジスティック回帰分析) による二次無効発現予測モデル

Variable	Coefficient	χ^2 value	P value	R ²
				0.1179
Age starting SU	0.062	21.9	<0.0001	
Years after diagnosis	-0.029	5.39	0.0202	
Gene A 003SNP	-0.325	4.93	0.0264	
Gene B 008SNP	-0.707	3.90	0.0483	

Analyzed by forward ($p < 0.1$) and backward ($p < 0.1$) stepwise procedures.

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

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

分担研究者 前川 京子 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 主任研究官

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（SU 剤）の二次無効との相関解析のために、Affymetrix 社の Gene Chip Human Mapping 250K Nsp Array を用いたゲノム網羅的遺伝子多型解析を継続した。SU 剤長期有効患者 30 名、二次無効患者 19 名による試験的な相関解析の結果、129 個の多型が有意に二次無効と相関した。

A. 研究目的

日本人における糖尿病の約95%以上を占める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（主として、スルホニルウレア型糖尿病薬：SU剤）が繁用されている。しかし、SU剤の「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、という現象が、糖尿病の診療において約2割で発生する。二次無効により血糖コントロールが不良になり高血糖状態が続くと、インスリン感受性の低下や膵臓細胞死によるインスリン分泌低下を引き起こし、さらなる薬効低下・合併症の併発をもたらす。二次無効の発現が予測可能となれば、当該患者に対し、他の作用機構を有する経口糖尿病薬の使用や併用、又はインスリン治療への早期移行等を行うことが可能となり、患者のQOLの向上や合併症の減少につながると期待される。

SU剤の二次無効は、膵β細胞の「疲弊」などと表現されることもあるが、その分子メカニズムは明らかでない。また、二次無効に遺伝因

子が関与することは示唆されつつも、これと相関する多型についての報告は、欧米人を対象とした*IRSI*及び*KCNJ11*に関する2報のみである。そこで本研究では、ゲノム網羅的遺伝子多型の解析により二次無効と相関する多型を探索することを目的とする。

B. 研究方法

1) Gene Chip Human Mapping 250K Nsp Array を用いたアッセイ

実験は、分担研究者安田和基先生（国立国際医療センター研究所）より供与されたSU 剤長期有効患者 288 名、二次無効患者 82 名のゲノム DNA を試料とし、Affymetrix 社の添付のマニュアルに従い、行った。すなわち、全ゲノム DNA 250 ng を制限酵素 Nsp I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) で消化し、4 塩基(bp)の特異的突出末端に対応するアダプター (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp assay kit に含む、Affymetrix Japan Inc., 東京) を T4 DNA Ligase (New England Biolabs) を用いて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、アダプター配列を認識するプライマー (PCR Primer 002, Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp assay kit に含む、Affymetrix Japan Inc.) を用いて PCR 増幅した。すなわち、鋳型 DNA、プライマー、TITANIUM Taq DNA polymerase (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA)、dNTP mixture (宝バイオ㈱、滋賀) 及び添加剤として GC-Melt (宝バイオ㈱) を含む PCR 反応溶液を、94°C で 3 分処理後、94°C で 30 秒、60°C で 45 秒、及び 68°C で 15 秒を 30 サイクル行い、最後に 68°C で 7 分処理した。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後、DNA Amplification Clean-Up Kits (Clontech Laboratories, Inc.) を用いて PCR 産物を精製した。精製した PCR 産物を吸光度法により定量し、その 90 µg を DNase I (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp assay kit に含む、Affymetrix Japan Inc.) を用いて断片化した。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、Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Affymetrix GeneChip Mapping 250K Nsp assay kit に含む、Affymetrix Japan Inc.) を用いて末端標識した。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 (Hybridization oven 640, Affymetrix Japan Inc.)。インキュベーション後、アレイを洗浄・染色し (Fluidics Station 450, Affymetrix Japan Inc.)、専用スキャナー (GeneChip Scanner 3000, Affymetrix Japan Inc.) 及び GeneChip Operating Software (GCOS, Affymetrix Japan Inc.) を用いて蛍光画像を解析した。

2) ジェノタイプの決定、データクリーニング及び相関解析

GeneChip Genotyping Analysis Software (GTYPE, Affymetrix Japan Inc.) にて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ごとのアレル判定率を評価した。DM アルゴリズムによるアレル判定率が 93% 以下の場合には再実験を行うとともに、Modified Partitioning Around Medoids Mapping (MPAM) アルゴリズムによりサンプルにコンタミネーションがないことを確認した。DM アルゴリズムにより 93% 以上のアレル判定率が得られたサンプルは 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、得られた遺伝子型を最終判定とし、以後の解析に使用した。

全タイピングデータは、GTYPE により (A) 「各多型につきアレル判定率が 90% 以上であり」、かつ (B) 「Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) 検定により $p > 0.00001$ 」、かつ (C) 「minor allele frequency (MAF) が 5% 以上であること」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。

相関解析には、フリーソフトウェア Haploview (Barrett JC et al., Bioinformatics 21: 263-265 (2005)) 及び市販ソフトウェア SNPalyze (Dynacom, Yokohama, Japan) を使用し、(1) 対立遺伝子 (Allele) モデル、(2) 共有性 (codominant) モデル、(3) 優性 (dominant) モデル、(4) 劣性 (recessive) モデルに対するカイ二乗検定により評価した。相関解析における検出力の算出には、フリーソフトウェアの R を使用した。

(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) Gene Chip Human Mapping 250K Nsp Array を用いた アッセイ

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レル判定率は 94.78% (AA call: 39.29%, AB call 23.90%, BB call: 36.81%) であり、BRLMM アルゴリズムによる平均アレル判定率は 98.64% (AA call: 38.25%, AB call 25.26%, BB call: 36.49%) であった。解析済み検体数が 49 検体とまだ少ないため、予備的検討ではあるが、これらを用いて以下の相関解析を行った。

2) データクリーニング及び相関解析

Nsp Array に含まれる 262,264 個の single nucleotide polymorphism (SNP) のうち、(A) 「各多型につきアレル判定率が 90% 以上であり」、かつ (B) 「HWE 検定により $p > 0.00001$ 」、かつ (C) 「MAF が 5% 以上であること」のすべての条件を満たす SNP は 172,185 個であり、全 SNP 総数の 65.7% であった。これらの SNP の各染色体 (Chr1-Chr22, ChrX) ごとの分布を表 1 に示す。上記の 3 条件を満たす SNP は X 染色体を除き、全ての染色体に均等に分布していた。

フィルタリング後の SNP 172,185 個につき、対立遺伝子モデルにより SU 剤長期有効患者群と二次無効患者群間でアレル頻度の差をカイ二乗検定により評価した。表 1 に示すように 129 個の SNP が $p < 0.001$ の相関を示

した。これら 129 個の SNP のアレル判定率、HWE 検定の p 値、MAF の平均値はそれぞれ、99.5%、 $p = 0.58$ 、MAF = 0.30 であった。最も低い p 値を示した SNP 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、共有性 (codominant) モデルでは $p = 7.2 \times 10^{-5}$ で、二次無効と相関した。その他、一部の強い相関を示した SNP につき、その解析結果を表 2 にまとめた。これらの中には、アポトーシスに関与するプロテインキナーゼ、細胞内カルシウム濃度の調節に働くチャネル、糖新生に関与する酵素等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 SNP 等が含まれていた。

D. 考察

SU 剤の二次無効は、臨床上約 2 割で認められるが、その分子メカニズムが不明な点が多く、これと相関する遺伝子多型を探索するためには網羅的遺伝子多型解析が最も有効な手段である。しかし、ゲノム網羅的多型解析においては、多量な遺伝子多型データを扱うため、その品質管理 (クリーニング) が偽陽性、偽陰性を排除するために不可欠である。今回、各 Chip のアレル判定率を 93% 以上とし、SNP ごとのアレル判定率を 90% 以上、マイナーアレル頻度を 5% 以上に設定してデータを抽出した。今後の解析においてもこれらの指標を適用し、タイピングエラー SNP を除去し、測定の正確性を保証していく。また、遺伝継承法則への適合性に関しては、HWE からのずれをカイ二乗検定により検定しているが、今回は解析検体数が少ないため、 $p < 0.00001$ と設定した。しかし、実際には、二次無効と有意な相関を示した 129 個の SNP のうち 127

個の HWE 検定の p 値は $p > 0.01$ であった。今後、HWE の検定法として確率点確率点プロット法 (Balding DJ et al., *Nature Reviews Genetics* 7: 781-791 (2006)) や Q value 法 (Storey DJ et al., *Annals of Statistics* 31: 2013-2035 (2003)) についても検討していきたい。

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、糖新生に関与するタンパク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 SNP が含まれていたが、現時点でこれらの SNP の二次無効への関与を議論するに十分な検体数には達していない。図 1 に、解析検体数を SU 剤長期有効患者 200 名、二次無効患者 100 名で行う際の検出力と、対照群のリスクアレル頻度との関係を、オッズ比ごとに示した。今後は、これに基づき、実験を継続し、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 SNP 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 (多型同士の染色体上の連鎖) を同定する。

E. 結論

SU 剤の二次無効と相関する遺伝子多型を探索するため、Affymetrix 社の Gene Chip Human Mapping 250K Nsp Array を用いたゲノム網羅的遺伝子多型解析を継続した。解析が終了した 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、これらの中には、アポトーシス、シグナル伝達、糖新生に関与するタンパク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 SNP が含まれていた。

なお、協力研究者である国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部・澤田純一部長、及び検出力の試算(図 1)にご協力頂いた(株)スタージェンの上辻茂男博士に感謝する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

2. 学会発表

- 1) Keiko Maekawa, Hiromi Fukushima-Uesaka, Masahiro Tohkin, Hiroshi Kajio, Kazuki Yasuda, Manabu Kawamoto, Naoyuki Kamatani, Kazuko Suzuki, Tatsuo Yanagawa, Yoshiro Saito and Jun-ichi Sawada: FOUR NOVEL DEFECTIVE ALLELES AND COMPREHENSIVE HAPLOTYPE ANALYSIS OF CYP2C9 IN A JAPANESE POPULATION. 第 16 回マイクロソームと薬物酸化に関する国際シンポジウム、ハンガリー、ブダペスト市、2006 年 9 月。
- 2) 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、東京、2006 年 11 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況なし。

表1 データクリーニング及び相関解析

染色体	総タイプ	フィルタリング後の		対立遺伝子モデルにより $p < 0.001$ を示した SNP 数 (個)
	SNP 数 (個)	解析 SNP 数 (個)	(%)	
Chr1	19865	13035	65.6	11
Chr2	22213	14568	65.6	14
Chr3	18379	12269	66.8	8
Chr4	19058	12311	64.6	12
Chr5	17164	11625	67.7	1
Chr6	17144	11867	69.2	9
Chr7	13950	9558	68.5	8
Chr8	14839	10054	67.8	8
Chr9	11941	8180	68.5	5
Chr10	14277	9473	66.4	13
Chr11	13306	9007	67.7	7
Chr12	13058	8767	67.1	2
Chr13	11117	7384	66.4	5
Chr14	8181	5480	67	3
Chr15	7011	4670	66.6	5
Chr16	7024	4777	68	4
Chr17	4854	3225	66.4	0
Chr18	8148	5277	64.8	4
Chr19	2692	1834	68.1	0
Chr20	5837	3912	67	4
Chr21	3935	2689	68.3	5
Chr22	2519	1624	64.5	1
ChrX	5705	599	10.5	0
不明	47			
計	262264	172185	65.7	129

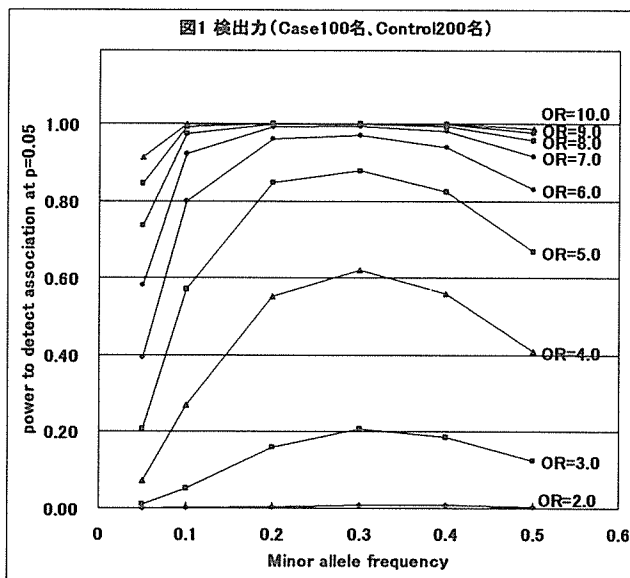


表2 二次無効と相関したSNPの例

SNP	染色体	マイナーアレル頻度		オッズ比	95%信頼区間	p値
		SU剤長期有効患者	SU剤二次無効患者			
SNP1	4q	0.250	0.711	7.4	3.0-18.3	7.2×10^{-6}
SNP2	2p	0.167	0.579	6.9	2.7-17.5	2.2×10^{-5}
SNP3	13q	0.333	0.737	5.6	2.3-13.8	9.9×10^{-5}
SNP4	3q	0.217	0.605	5.5	2.3-13.6	1.0×10^{-4}
SNP5	15q	0.217	0.605	5.5	2.3-13.6	1.0×10^{-4}
SNP6	15q	0.467	0.105	0.13	0.04-0.43	2.0×10^{-4}
SNP7	7q	0.200	0.553	4.9	2.0-12.2	3.2×10^{-4}
SNP8	2q	0.379	0.750	4.9	2.0-12.3	4.7×10^{-4}
SNP9	15q	0.000	0.184	-	-	5.6×10^{-4}
SNP10	20q	0.183	0.500	4.5	1.8-11.1	9.2×10^{-4}

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

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

分担研究者 埴岡伸光 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 助教授

研究要旨:本研究はトルブタミドなどのインスリン分泌促進薬の酸化的代謝に関与するシトクロム P450 2C19 (CYP2C19) のアミノ酸置換を伴う2種の変異型遺伝子 (CYP2C19*18 及び CYP2C19*19) がコードする酵素機能を明らかにすることを目的とした。野生型 CYP2C19 (CYP2C19*1C) 及び変異型 CYP2C19 (CYP2C19*18 及び CYP2C19*19) cDNA を作製し、それぞれの酵素蛋白質 (CYP2C19.1B (野生型)、CYP2C19.18 及び CYP2C19.19) を酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* AH22 株) で発現した。酵素機能の解析は *S*-メフェニトイン 4'-水酸化及びオメプラゾール 5-水酸化活性を測定することにより行った。野生型及び変異型 CYP2C19 を発現させた酵母細胞マイクロゾームを用いたウェスタンブロット分析を行った。陰性対照を除く野生型及び変異型 CYP2C19 いずれにおいても抗ヒト CYP2C19 抗体と交差するタンパク質バンドが検出され、そのバンド強度は CYP2C19.18>CYP2C19.1B>CYP2C19.19 の順であった。また、CYP2C19 発現酵母細胞マイクロゾームを用いて還元型 CO 差スペクトルを測定し、野生型及び変異型 CYP2C19 のいずれにおいても 450 nm に吸収極大を示すことを確認した。それらの機能性 CYP 含量は CYP2C19.18>CYP2C19.1B>CYP2C19.19 の順であり、ウェスタンブロット分析の結果とほぼ一致していた。CYP2C19 発現酵母細胞マイクロゾームを酵素源にして *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。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 に比べて有意に高く、マイクロゾームタンパク質量及び CYP 含量当たりの V_{max}/K_m 値は有意に低かった。これに対し、CYP2C19.18 の K_m 、 V_{max} 及び V_{max}/K_m 値は野生型 CYP2C19 とほぼ同程度であった。オメプラゾール 5-水酸化反応においても CYP2C19.19 の K_m 値は野生型 CYP2C19 に比べ有意に高かった。しかし、CYP 含量当たりの V_{max}/K_m 値は野生型 CYP2C19 とほぼ同程度であった。これらの結果から、CYP2C19*18 が引き起こす Arg329His 置換は CYP2C19 の酵素機能にはほとんど影響を与えないが、CYP2C19*19 が引き起こす Ser51Gly 置換は CYP2C19 の基質 (*S*-メフェニトイン及びオメプラゾール) に対する親和性を共に低下させるが、このアミノ酸置換による酵素機能変化の程度は基質により異なることが示唆された。

A. 研究目的

トルブタミド、グリメピリドやグリベンクラミドなどのインスリン分泌促進型経口糖尿病薬 (SU 剤) は2型糖尿病治療の第一選択薬としてよく使用されている。しかし、SU 剤にはノンレスポonderが一定の割合で見られると共に、逆に薬効が強くなることによる低血糖等の副作用が知られており、これが治療における投与規定因子となってい

る。

SU 剤は主に肝臓に発現しているシトクロム P450 (CYP) により代謝されることが報告されている。なかでも CYP2C 分子種 (CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19) がそれらの代謝に重要な役割を果たしていることが示唆されている。これら CYP2C には遺伝子多型が存在することはよく知られているが、特にトルブタミドの酸化的代謝に関与する CYP2C19