

ヒト臨床試験において、プラバスタチンの血中濃度が OATP1B1 の遺伝子多型により影響を受けることを実証した<sup>26)</sup> (図 2-19)。現在では、他の薬剤の血中濃度についても OATP1B1 の多型により影響を受けうることが報告されている<sup>27~30)</sup>。最終的には、酵素やトランスポーター発現系を用いる *in vitro* 試験 (薬物間相互作用の解析、遺伝子多型に基づく機能変化の解析) の結果を基に、数学モデルを用いて、細胞レベル・器官レベル・個体レベルへ段階を追って、定量的に予測を進めるための解析手法の確立が必要となる (図 2-20)。これらの手法についても、理論面はほぼ確立しており、今後の事例の集積が望まれる。

現在、多数の製薬企業の協力を得て、薬物間相互作用の予測を定量的に行うことのできるシミュレーター機能をもった薬物間相互作用データベースを開発中である (図 2-21)。この相互作用は、代謝酵素レベルのもの (競合, 非競合, mechanism-based inhibition を含む) のみならず、薬物トランスポーターレベルで生じるものも含む。また、代謝酵素, トランスポーターの両方が薬物動態に関わるより複雑なケースにおいても、血中濃度, 標的臓器, 副作用関連臓器における薬物濃度の時間推移の予測, さらには薬物間相互作用, 遺伝子多型による薬物動態の個人差の予測を可能にする生理学的薬物速度論モデル (PBPK model) の開発にも着手している。さらには、近年、文献報告が急増してきた薬物トランスポーターに関するあらゆる情報を整理した統合データベース “TP-search” を Web 上に公開している (URL : <http://www.TP-Search.jp/>)<sup>31)</sup> (図 2-22)。ここには、基質・阻害剤・臓器分布・薬物間相互作用・遺伝子多型・発現変動などあらゆる側面からのトランスポーターの文献情報を整理し、ユーザーが必要な情報だけをあらゆる角度から抽出可能な検索モードを用意している。また詳細な情報を容易に手に入れられるよう、個々のレコードはすべて PubMed の書誌情報にリンクしている。将来、このようなデータベースをシミュレーターと連結させることで、トランスポーターに関しても様々な薬物動態の予測が可能になるものと考えている。

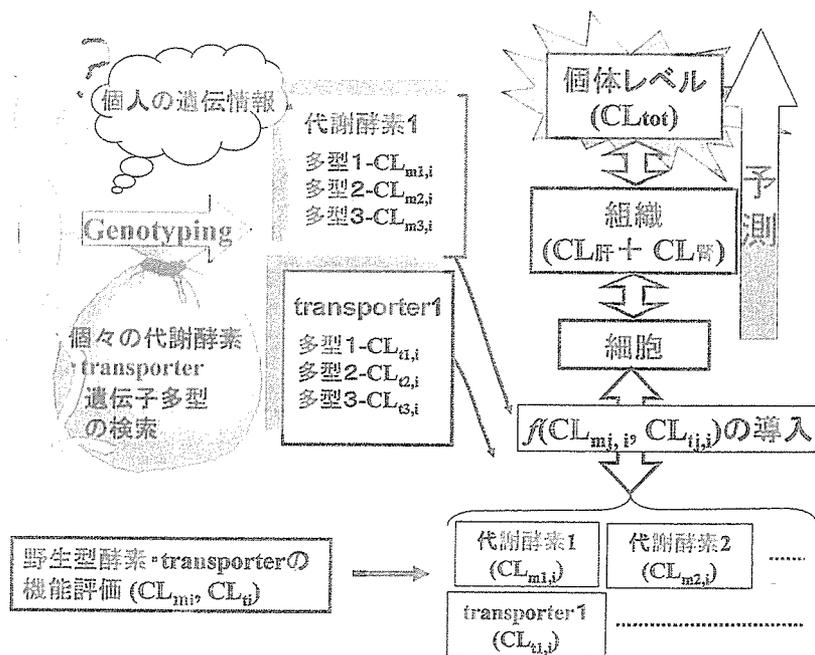


図 2-20 薬物動態関連遺伝子の遺伝子多型による *in vivo* 薬物動態の変化の *in vitro* 実験からの予測法

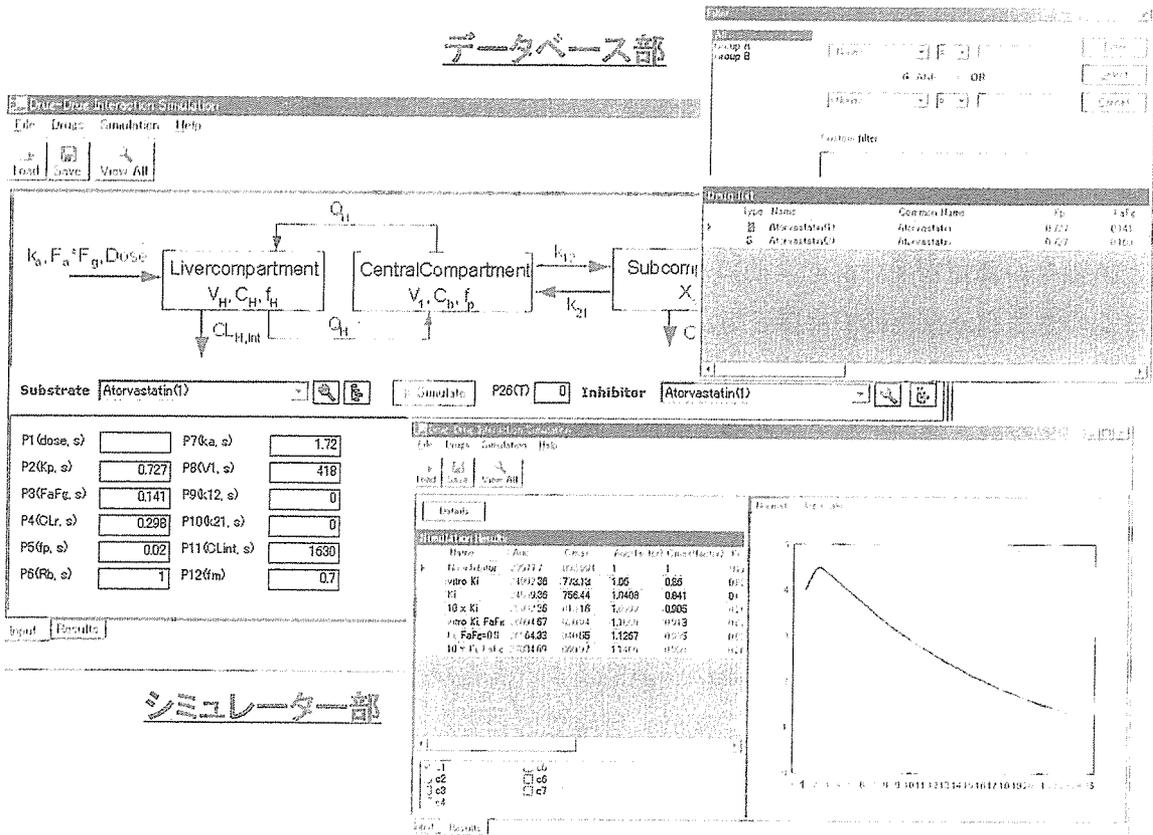


図 2-21 データベースをもつ薬物間相互作用シミュレーターの開発

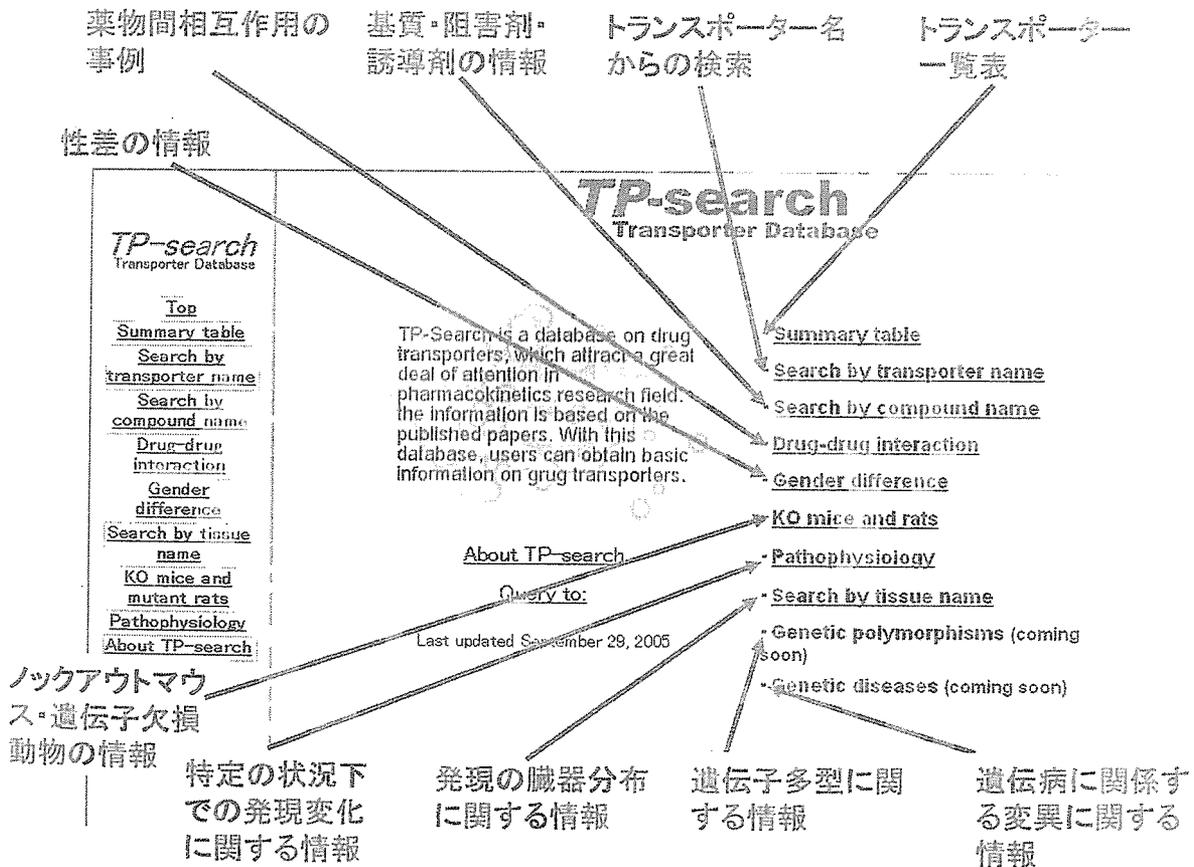


図 2-22 薬物トランスポーター情報統合データベース“TP-Search”の開発

## 2-3

## 臨床から臨床への橋渡し— Virtual Clinical Trials —

健常人を対象にした第1相試験は被験者の数も比較的少なく、開発上、それほど大きな負担になっていないことが多い。経済的にも時間的にも critical な過程は、第2相以後の臨床試験である。このような過程を経て市場に出た医薬品が、薬物動態特性の悪さのために市場から撤退せざるを得なくなることは絶対に避けるべきである。動態特性の悪さとは、多くの場合、個々人の遺伝的背景や薬物・食物などとの相互作用に起因する、血中濃度や薬効・副作用に関わる標的組織中の薬物濃度の個人間変動の大きさや、頻度の多さによるところが大きいと考えられる。このような背景のもと、遺伝子多型の診断に基づく層別化臨床試験の考え方が生まれてきている。確かに、層別化臨床試験が実施され、市場に出た後も遺伝子多型に基づく投薬が行われるならば、個人間変動を大きく低下させることにつながるであろう。しかしながら、動態の個人間変動が必ずしも、酵素、トランスポーターの遺伝子多型によるものだけでなく、その発現を制御している転写因子、核内レセプター側の遺伝子変異、環境要因によるものなどがあり、すべての個人間変動の機構が解析されているわけではないことに注意する必要がある。私は、最近 Virtual Clinical Trials の可能性について考えている (図 2-23)<sup>1,2)</sup>。この実現のためには、薬物動態を支配する個々の要因 (血中タンパク結合性、消化管吸収性、組織分布特性、代謝輸送特性 (各酵素、トランスポーター別に)) について平均値のみでなく、その変動幅を過去のポピュレーションファーマコキネティクス (PPK) を扱った論文を基に整理しデータベースを作成し、これらの個々のパラメータ値と、年齢、体重、性、腎機能、肝機能と薬物動態との関係についても、データベース

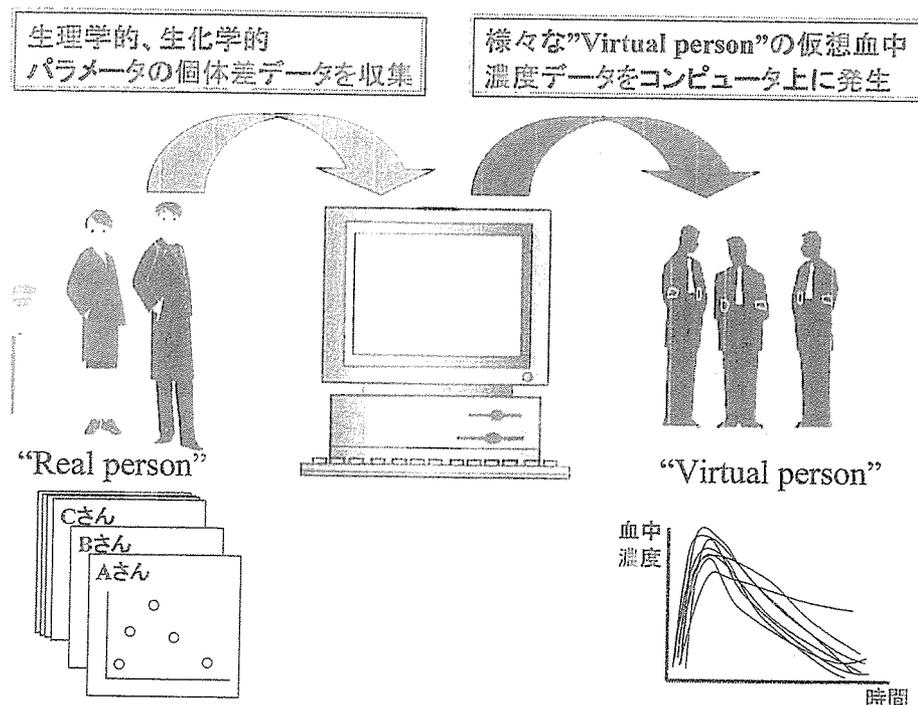


図 2-23 Virtual Clinical Trials の概念

として整理することが必要である。これらのデータベースが充実すれば、新規薬剤について第1相の臨床試験が終了した段階で、その薬物動態的特性（どの代謝酵素、トランスポーターの基質になり、それぞれの寄与率がどの程度であるかなどの情報）を考慮して、データベース情報とあわせて、臨床第2相・第3相試験、市場に出た後の薬物の血中濃度、標的組織中の薬物濃度推移について、モンテカルロシミュレーションによりコンピュータを用いて、多くの患者群のデータを仮想的に計算することができる。理想的には、このような計算により、短期間に多数の患者（年齢、体重、性、腎・肝機能の異なる種々の背景をもった）を対象にした臨床試験をコンピュータ上で実施することができることになる。その結果、例えば、血中濃度、標的組織中濃度にどの程度の個人間変動が生じるのかについて、定量的に予測することが可能となる。また、幾つかの遺伝子診断の結果と組み合わせると、その個人間変動がどの程度減少するのか、という情報が得られることになり、薬効、副作用などに関する他の情報と統合することにより、どの程度の割合の患者が薬物動態の個人差のために副作用を生じ、また、薬効が期待できないのか、という予測が可能になるであろう。このようなシミュレーションは、前臨床から臨床にあげる化合物を絞り込む時にも有効であろうと考えている。

## まとめおよび今後の展開

今後、必要とされるのは、「はじめに」にも述べたように、複数の動態特性から薬効・副作用組織における薬物暴露を予測する方法論、さらには、これら情報を、薬効、副作用のスクリーニング情報と統合するための方法論の開発である。私は、本方法論を QIDSM (Quantitative Integrated Drug Selection Method) と呼び、すでにその具体的な方法論についても提案している<sup>1,2)</sup> (図 2-2)。

最終的には、科学的根拠に基づき、動態的特性を optimize し、個人間変動が少なく、相互作用を受けづらく、かつ薬効標的への選択的デリバリーにより、治療域の広い薬剤を開発することができれば、薬効メカニズムが同じ薬剤でも、再度、大きな市場を占有する化合物を開発することが可能であると考えている。そのためには、メデイシナルケミスト、薬理学/薬物毒性学、薬物動態の研究者の間での継続したコミュニケーションとフィードバックが必須であり、単なる協力関係だけでは十分でないと感じている。互いの領域にさらに数歩踏み込んで理解できる総合科学の力を、それぞれの領域の研究者が強化することにより、相互の理解が深まるものと信じている。

最後に、私の研究室の HP にも是非とも訪問いただきたい。

(URL : <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~sugiyama/>)

## 参考文献

- 1) 杉山雄一. 21世紀の薬物動態研究はどこまで進むか. 月刊薬事 2002; 44(臨時増刊号): 721-9.
- 2) 杉山雄一, 設楽悦久, 加藤基浩, 水野尚美. 薬物動態特性の最適化戦略. In: 日本薬学会編, 編集代表 杉山雄一. 次世代ゲノム創薬. 東京: 中山書店, 2003; 173-205
- 3) Sugiyama Y. Druggability: selecting optimized drug candidates. *Drug Discov Today* 2005; 10(23-24):

1577-9.

- 4) Chiba M, Shibata Y, Takahashi H, Ishii Y, Sugiyama Y. Prediction of hepatic clearance in humans from experimental animals and in vitro data. In: Fisher MB, Obach RS, Lee JS, editors. Drug metabolizing enzymes: cytochrome P450 and other enzymes in drug discovery and development: Fontis Media and Marcel Dekker. 2003; 453-81.
- 5) Giacomini KM, Sugiyama Y. Membrane transporters and drug response. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editors. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 11th edition. New York: McGraw-Hill. 2005; 41-70.
- 6) Tanaka E, Kurata N, Yasuhara H. How useful is the "cocktail approach" for evaluating human hepatic drug metabolizing capacity using cytochrome P450 phenotyping probes in vivo? *J Clin Pharm Ther* 2003; 28(3): 157-65.
- 7) Chainuvati S, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A, Kearns GL, Sellers E, et al. Combined phenotypic assessment of cytochrome p450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the "Cooperstown 5+1 cocktail". *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74(5): 437-47.
- 8) Frye RF, Matzke GR, Adedoyin A, Porter JA, Branch RA. Validation of the five-drug "Pittsburgh cocktail" approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62(4): 365-76.
- 9) Iwatsubo T, Hisaka A, Suzuki H, Sugiyama Y. Prediction of in vivo nonlinear first-pass hepatic metabolism of YM796 from in vitro metabolic data. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286(1): 122-7.
- 10) Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H, Sugiyama Y. Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev* 1998; 50(3): 387-412.
- 11) 杉山雄一, 山下伸二, 加藤基浩編集. ファーマコキネティクス -演習による理解-. 東京: 南山堂, 2003.
- 12) Kanamitsu SI, Ito K, Okuda H, Ogura K, Watabe T, Muro K, et al. Prediction of in vivo drug-drug interactions based on mechanism-based inhibition from in vitro data: inhibition of 5-fluorouracil metabolism by (E)-5-(2-Bromovinyl) uracil. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(4): 467-74.
- 13) Tahara H, Kusuhara H, Endou H, Koepsell H, Imaoka T, Fuse E, et al. A species difference in the transport activities of H2 receptor antagonists by rat and human renal organic anion and cation transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315(1): 337-45.
- 14) Nagata Y, Kusuhara H, Hirono S, Endou H, Sugiyama Y. Carrier-mediated uptake of H2-receptor antagonists by the rat choroid plexus: involvement of rat organic anion transporter 3. *Drug Metab Dispos* 2004; 32(9): 1040-7.
- 15) Tahara H, Kusuhara H, Chida M, Fuse E, Sugiyama Y. Is the monkey an appropriate animal model to examine drug-drug interactions involving renal clearance? Effect of probenecid on the renal elimination of H2 receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*, in press.
- 16) Kusuhara H, Sugiyama Y. Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *J Control Release* 2002; 78(1-3):

43-54.

- 17) Suzuki H, Sugiyama Y. Hepatic drug transport. In: van de Waterbeemd H, Artursson P, Lennernas H, editors. Drug bioavailability: estimation of solubility, permeability and bioavailability: Wiley; 2003; 288-310.
- 18) Ishizuka H, Konno K, Naganuma H, Sasahara K, Kawahara Y, Niinuma K, et al. Temocaprilat, a novel angiotensin-converting enzyme inhibitor, is excreted in bile via an ATP-dependent active transporter (cMOAT) that is deficient in Eisai hyperbilirubinemic mutant rats (EHBR). *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **280**(3): 1304-11.
- 19) Sasaki M, Suzuki H, Ito K, Abe T, Sugiyama Y. Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *J Biol Chem* 2002; **277**(8): 6497-503.
- 20) Sasaki M, Suzuki H, Aoki J, Ito K, Meier PJ, Sugiyama Y. Prediction of in vivo biliary clearance from the in vitro transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II monolayer expressing both rat organic anion transporting polypeptide 4 and multidrug resistance associated protein 2. *Mol Pharmacol* 2004; **66**(3): 450-9.
- 21) Matsushima S, Maeda K, Kondo C, Hirano M, Sasaki M, Suzuki H, et al. Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using double-transfected Madin-Darby canine kidney II cells expressing human organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)/multidrug resistance-associated protein 2, OATP1B1/multidrug resistance 1, and OATP1B1/breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **314**(3): 1059-67.
- 22) Hirano M, Maeda K, Matsushima S, Nozaki Y, Kusuhara H, Sugiyama Y. Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol Pharmacol* 2005; **68**(3): 800-7.
- 23) Shitara Y, Sato H, Sugiyama Y. Evaluation of drug-drug interaction in the hepatobiliary and renal transport of drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; **45**: 689-723.
- 24) Shitara Y, Itoh T, Sato H, Li AP, Sugiyama Y. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **304**(2): 610-6.
- 25) Shitara Y, Hirano M, Sato H, Sugiyama Y. Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1:SLC21A6)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of cerivastatin: analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **311**(1): 228-36.
- 26) Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, Kawabata K, Hirota T, et al. Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2003; **73**(6): 554-65.
- 27) Maeda K, Ieiri I, Yasuda K, Fujino A, Fujiwara H, Otsubo K, et al. Effects of OATP1B1 haplotype on pharmacokinetics of pravastatin, valsartan and temocapril. *Clin Pharmacol Ther*, in press.
- 28) Niemi M, Backman JT, Kajosaari LI, Leathart JB, Neuvonen M, Daly AK, et al. Polymorphic organic

- anion transporting polypeptide 1B1 is a major determinant of repaglinide pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2005; **77**(6): 468-78.
- 29) Niemi M, Kivisto KT, Hofmann U, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Fexofenadine pharmacokinetics are associated with a polymorphism of the SLCO1B1 gene (encoding OATP1B1). *Br J Clin Pharmacol* 2005; **59**(5): 602-4.
- 30) Chung JY, Cho JY, Yu KS, Kim JR, Oh DS, Jung HR, et al. Effect of OATP1B1 (SLCO1B1) variant alleles on the pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2005; **78**(4): 342-50.
- 31) Ozawa N, Shimizu T, Morita R, Yokono Y, Ochiai T, Munesada K, et al. Transporter database, TP-Search: a web-accessible comprehensive database for research in pharmacokinetics of drugs. *Pharm Res* 2004; **21**(11): 2133-4.

ヒトゲノムに見られる代表的な多型はマイクロサテライト多型と単一塩基多型 (SNP) である。マイクロサテライト多型は疾患遺伝子探索研究における連鎖解析に頻用されるとともに、個体識別などのDNA鑑定にも有用である。その解析には、ゲル電気泳動と銀染色を組み合わせるか、蛍光標識プライマーを用いたPCR産物を自動シークエンサーで解析する場合が多い。一方、SNPは疾患遺伝子の候補領域から疾患遺伝子を絞り込む段階で有用な多型である。対立遺伝子の判別原理はハイブリダイゼーション、特異的プライマー伸長、一本鎖あるいは二本鎖の構造差の検出など限られているが、検出方法等にさまざまな工夫がなされ多様な技術が開発されている。最近、微量のゲノムDNAから全ゲノムを増幅する技術やゲノム全域に分布する数十万種ものSNPsを一挙に解析する技術も実用化されている。

### 1.1 遺伝子・ゲノムの多型

ヒトゲノムに見られる代表的な多型として、マイクロサテライト多型と単一塩基多型 (SNP) がある。前者は短い塩基配列の繰り返し回数に見られる多型である。疾患遺伝子探索研究における連鎖解析に頻用される。後者は塩基1個の差異からなる。ヒトゲノム中には500万から1,000万種類も存在すると推定され、最も高密度に存在する多型である。疾患遺伝子の候補領域から疾患遺伝子を絞り込む段階で有用な多型である。

#### 1) 代表的な遺伝子・ゲノム多型

ヒトゲノムが生物種としてのヒト (Homo Sapiens) に必要な遺伝情報のすべてを担っていることは言うまでもない。一方で、ヒトゲノム中には数多くの多型 (polymorphism) ・変異 (variation) が存在する<sup>2)</sup>。このような多型・変異は、それ自体が何らかの機能上の意義を持つのかどうかにかかわらず、ヒトのさまざまな疾患や特徴にかかわる遺伝子を探索したり、人類集団の遺伝的近縁性や起源・形成過程を推定する上で有用な標識 (マーカー) として用いられる。表1-1は、ヒトの疾患関連遺伝子の探索において用いられる主な多型マーカーを示す。まず、反復配列 (repetitive sequence) と総称されるグループの中によく用いられる2種のマーカーがある。

ミニサテライト (minisatellite) あるいはVNTR (variable number of tandem repeat) と呼ばれる配列は、10~100bp程度の配列が繰り返しの単位となり、通常20~50回程度の繰り返しが見られるが、この繰り返しの回数に多型が見られる。ミニサテライトは数年前まで疾患遺伝子の連鎖解析にもよく用いられてきた。また法医学において、個人識別や親子鑑定に広く用いられてきたフィンガープリント法はミニサテライトの多型を利用する方法である。

ミニサテライトに代わって、近年より頻繁に用いられるようになった反復配列多型がマイクロサテライト (microsatellite) あるいはSTR (short tandem repeat) の多型である。1~数bpの繰り返し単位で通常5~60回程度の繰り返しが見られ、この繰り返し回数に多型が存在する (図1-1)。ヒトゲノム中に広範に分布するマイクロサテライトのうち、多型を示すものがどの程度あるのか詳細は明らかになっていないが、数十万種類程度は存在すると推定される。マイクロサテライト多型が最もよく用いられているのは、各種の疾患や形質にかかわる遺伝子を同定するための連鎖解析や関連解析においてである。

SNP (single nucleotide polymorphism : 単一塩基多型) は、反復配列以外の多型の中で、



表1-1 ヒトゲノム中の主な多型マーカー

<p>反復配列 (repetitive sequence) の多型</p> <p>ミニサテライト (minisatellite) ・ VNTR (variable number of tandem repeat)</p> <p>10-100 bp × 20-50 repeats</p> <p>マイクロサテライト (microsatellite) ・ STR (short tandem repeat)</p> <p>1-9 bp × 5-60 repeats</p> <p>数十万カ所, 高度な多型性 → マッピング</p> <p>SNP (single nucleotide polymorphism : 単一塩基多型)</p> <p>約1,000万カ所, 二対立遺伝子</p> <p>SNPハプロタイプは高度な多型性 → 遺伝子特定</p>
---

図1-1 マイクロサテライト多型の例

(TA)<sub>5</sub>アレル TCCAGCCTCGGAG TATATATATAGTCCTTTCTCCAGA

(TA)<sub>6</sub>アレル TCCAGCCTCGGAG TATATATATATAGTCCTTTCTCCAGA

(TA)<sub>7</sub>アレル TCCAGCCTCGGAG TATATATATATATAGTCCTTTCTCCAGA

⋮

⋮

⋮

図1-2 単一塩基多型 (SNP) の例

--AGACTGTCCGAA TTGACCATGGTTCA--

⋮ (一方の鎖のみ表示)

⋮

--AGACTGTCCGAA CTGACCATGGTTCA--

個人の遺伝子型はTT, TCまたはCC型となる

疾患遺伝子の探索研究に最も汎用される遺伝マーカーである (図1-2)。ゲノム中の総数が500~1,000万種類, すなわち平均して約300~600bpごとに1個のSNPが存在すると推定され, ヒトゲノム中で最も高密度な分布を示す多型である。SNPの一部は, さまざまな多因子疾患の感受性あるいは抵抗性に直接関与すると考えられることから, 各種の疾患遺伝子 (多型) を特定するために必ず解析するマーカーである。

このほかに, ヒトゲノム中にはより大規模な多型も存在する。最近特に注目されているのが, 数kbから数百kbの規模で遺伝子あるいはゲノム断片のコピー数に多型・変異が認められる現象であり, CNV (copy number variation) と呼ばれる。現在その全体像を明らかにする研究が進んでおり, また疾患との関連研究が端緒についたばかりである。

注  
多型と変異: 頻度にかかわらず また 規模の大小にかかわらず, ゲノムに見られる差異はすべて変異と呼ばれる。一方, 多型は変異のうち, 頻度の低い対立遺伝子 (稀型でもよい) の合計が1%以上, 言い換えれば頻度の高い対立遺伝子が99%以下の状態にあるものという。

## 2) マイクロサテライト多型の特徴と用途

マイクロサテライト多型の例は図1-1に示した。ゲノム上のユニークな配列に挟まれて、数塩基程度の単純な配列の繰り返しが見られ、その繰り返し回数に個人差が認められる。通常、5種類以上の対立遺伝子があり、高いヘテロ接合度 (heterozygosity) を示す。すなわち大多数の人はヘテロ接合型になるので、個々のマイクロサテライト多型から得られる情報が多いのが特徴である。疾患や形質にかかわる遺伝子を探索するための連鎖解析や関連解析にしばしば使われる遺伝マーカーである。

図1-3はマイクロサテライト多型マーカーを用いた連鎖解析の例として、日本人小児喘息についての報告を示す<sup>1)</sup>。多発家系の試料をなるべく多数収集して、ゲノム全域にほぼ均等に分布する300~400種類程度のマイクロサテライト多型マーカーを解析し、その結果から染色体上の位置ごとに疾患遺伝子の存在確率を求める。連鎖に関する統計遺伝学的手法はいくつかあるが、現在では、いずれかの連鎖解析用プログラムを用いてコンピュータ計算するのが通常である (I部3章)。この例では、疾患遺伝子が存在する可能性の高いピーク (候補領域) がいくつか見られ、特に5番染色体上のピークが高いのが分かる。

マイクロサテライト多型マーカーのもう1つの応用例を図1-4に示す<sup>2)</sup>。骨髄移植や輸血の後に起こる副作用の1つにGVHD (移植片対宿主病) がある。これは、提供者 (ドナー) の免疫担当細胞が患者の組織を非自己と認識して攻撃するもので、拒絶反応とは反対の現象である。マイクロサテライト多型マーカーによる個人識別能力を生かして、GVHDの確定診断のために、患者血液中の白血球DNAのマイクロサテライト型がドナー由来の型に換わっていることを示している。

## 3) SNPの特徴と用途

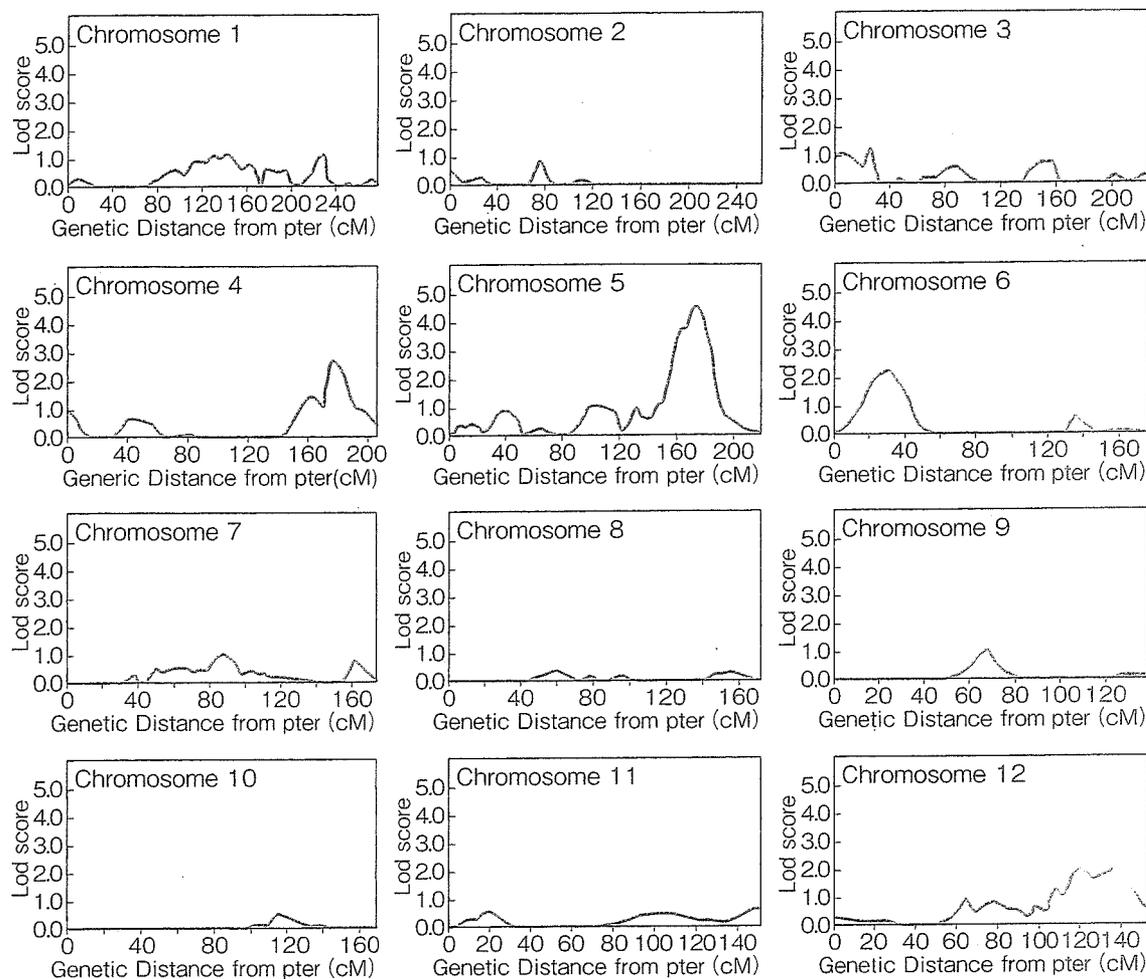
塩基1個の差異からなるSNPの1例は図1-2に示した。個々のSNPは対立遺伝子が2個に限られ情報量は多くない。しかしながら前述のごとく、ゲノム中の分布密度が高いため、それらの組み合わせ、すなわちSNPハプロタイプをマーカーと考えれば高度な多型性を示す。

図1-5に示したように、SNPsはその存在部位によって大別される。このうち、エクソン内にあるSNPやプロモーター領域にあって遺伝子発現量に影響するSNPなどは、イントロン部分にあるSNPや遺伝子と遺伝子の間にあるSNPより疾患感受性にかかわる可能性が高いと考えられる。

これらの疾患感受性/抵抗性遺伝子多型を見出す統計遺伝学方法についてはI部を参照いただきたい。疾患感受性遺伝子や抵抗性遺伝子を明らかにすることは、ゲノム創薬、個人化医療 (personalized medicine) や新しい予防医学を実現するためにも必要である。

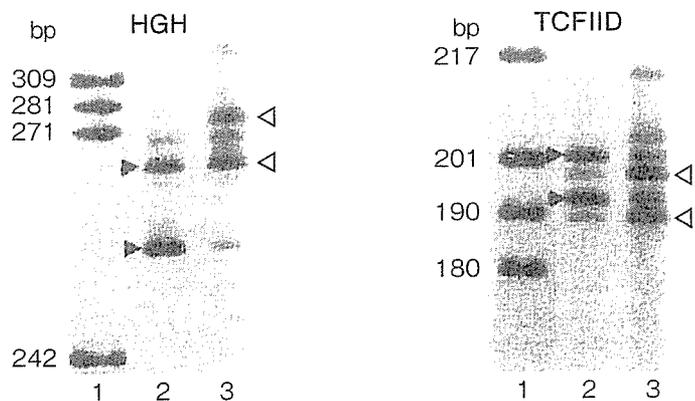
図1-6は、前述した喘息の連鎖解析 (図1-3) によって検出された候補領域について、多数のSNPを用いた関連解析を行うことにより、疾患遺伝子を同定することができた例である<sup>3)</sup>。一般に、連鎖解析によって検出される候補領域は広大であり、しばしば10Mb以上に及んで100個以上の遺伝子を含んでいる。この中から疾患遺伝子を特定するためには、この領域内に存在する多数のSNPについて、それらの間の連鎖不平衡を考慮しながら関連解析を行い、最も強い関連を示すSNPあるいはSNPハプロタイプを見出す必要がある (I部参照)。

図1-3 マイクロサテライト多型マーカーを用いた罹患同胞対法による連鎖解析の例：喘息，染色体1～12番の結果のみ表示



出典 参考文献1) より引用改変

図1-4 マイクロサテライト多型解析による輸血後GVHDの確定診断



2種のマイクロサテライト多型を解析した結果。それぞれ、レーン1はサイズマーカー、レーン2は患者皮膚（患者本来の型）、レーン3は患者末梢血（GVHD発症によってドナーの型が主になっている）から得られたパターン。

出典 参考文献2) より引用改変

図1-5 SNPの位置による分類

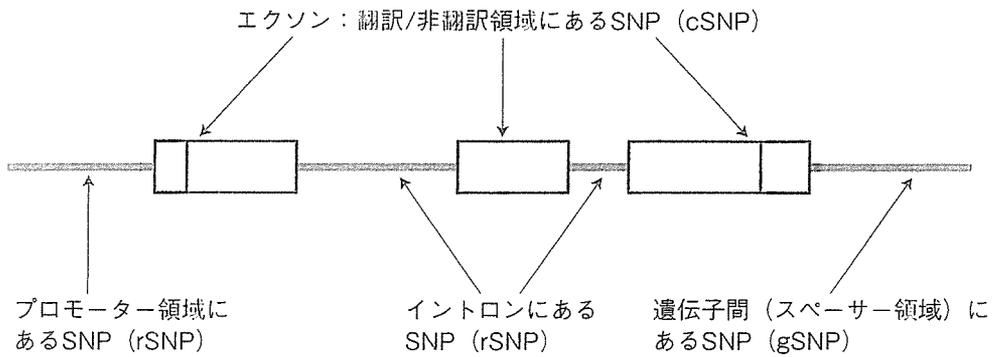
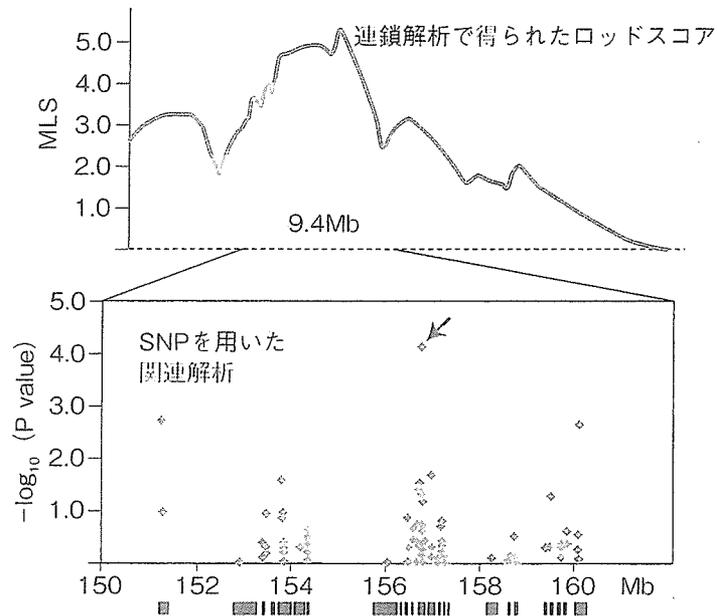


図1-6 SNPを用いた疾患遺伝子マッピングの例



連鎖解析 (図1-3参照) によって検出された5番染色体短腕上の候補領域について高密度のSNP関連解析を行った結果、矢印の位置に喘息感受性遺伝子があると推定された。  
出典 参考文献3) より引用改変

2.

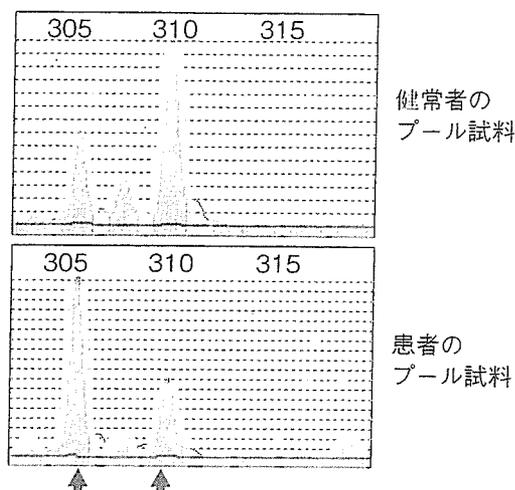
## 変異・多型の解析技術

マイクロサテライト多型の解析においては、ゲル電気泳動と銀染色を組み合わせるか、蛍光標識プライマーを用いたPCR産物を自動シーケンサーで解析するが多い。一方、SNP解析については、その判別原理はハイブリダイゼーション、特異的プライマー伸長など限られているものの、検出法などにはさまざまな工夫がなされ多様な技術が開発されている。最近、全ゲノム増幅技術や数十万種ものSNPsを一挙に解析する技術の発達も著しい。

### 1) マイクロサテライト多型の解析技術

マイクロサテライト多型の解析においては、繰り返し配列部分の両側にあるユニークな配列部分に相補的なPCRプライマーを設定する。PCR増幅断片を電気泳動してその長さを判別することにより、繰り返し回数を決定できる。先に紹介した図1-4はこの電気泳動後に銀染色を施して遺

図1-7 プール試料を用いた自動シーケンサーによるマイクロサテライトマーカーの対立遺伝子頻度推定



矢印の対立遺伝子については健常者と患者での頻度が異なることから、このマーカーと疾患が関連すると考えられる。

伝子型を決定した例である。一方、図1-7は多数の検体から得たゲノムDNAを等量ずつ混合したプール試料について解析した例である。蛍光プライマーを用いて標識されたPCR産物を、自動シーケンサーによって分離検出した泳動像であり、それぞれのピークの高さの相対値に基づいて各対立遺伝子の頻度を推定できる。疾患関連研究において、候補領域・遺伝子を検出するため多数のマイクロサテライト多型をスクリーニングする際に、コストや手間を省く手段として用いられることがある<sup>4)</sup>。

## 2) SNP解析技術

多因子疾患感受性遺伝子や薬剤応答性遺伝子の探索研究におけるSNP解析の有用性に加えて、個人化医療の時代におけるSNP検査の重要性が指摘されており、近年のSNPタイピング技術の進歩は目覚ましい。表1-2は主な方法について、その多型判別原理や測定法に基づいて分類したものである。それぞれに特徴があり、検体数や解析したいSNPの種類数などに応じて、適切な方法を選ぶことが望ましい<sup>5)</sup>。

Hybridizationを原理とする方法では、従来より用いられてきたナイロン膜上でのオリゴヌクレオチドプローブによるSNPタイピング法に加えて（図1-8）、マイクロタイタープレートなどを支持体として用いたり、従来とは逆にプローブをあらかじめ支持体に固定しておくなどの方法が確立されている（図1-9）。さらに処理能力を増大させるため、シリコンやガラスなどの基板を支持体としてSNP特異的オリゴヌクレオチドプローブを高密度に固定化しておき、hybridizeした検体DNAを蛍光測定法や電気化学的方法によって検出する方法があり、これらを一般にDNAチップと呼ぶ。チップを用いず、液相中でFRET (fluorescence resonance energy transfer) 法を用いる方法も開発されている。SNPの近傍の塩基配列はSNPごとに異なるため、多種類のSNPsを同一のhybridization-washing条件で精度良く判別することは容易ではないが、その検出段階でさまざまな工夫がなされている。

一方、hybridizationを用いるとともに、SNP自体の判別には酵素反応を組み合わせる方法と

表1-2 主なSNPタイピング技術

<p>Hybridizationを用いる</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・SSO (sequence specific oligonucleotide probing) 法</li> <li>・DNAチップ法</li> <li>・チップー電気化学的検出法</li> <li>・FRET検出法 など</li> </ul> <p>Hybridizationと酵素反応の組み合わせ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・Invader法</li> <li>・Sniper法 など</li> </ul> <p>構造の差異を検出する</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・SSCP (single strand conformation polymorphism) 法</li> <li>・DHPLC法 など</li> </ul> <p>特異的伸長反応を検出する</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・SSP (sequence specific primer) 法</li> <li>・MALDI-TOF/MS法</li> <li>・一分子蛍光検出法 など</li> </ul> <p>塩基配列決定法を用いる</p>
---

図1-8 PCR-SSO法の原理

(PCR後、加熱変性して一本鎖にした検体DNAをナイロン膜上に固定する)



して、cleavaseとFRET測定を用いるInvader法や、ligaseとRolling circle DNA amplificationを用いるSniper法がある。どちらも大量検体のタイピングを目指す方法である。また、ビーズを支持体としてligaseを用い、プローブごとに異なる波長の蛍光を発するよう標識するLuminex法などもある。

Hybridizationを用いない方法として、DNA二本鎖あるいは一本鎖の構造の違いを検出する方法がある。特に、一本鎖DNAの構造の違いを検出するSSCP (single strand conformation polymorphism) 法は比較的簡便な方法として広く用いられている。図1-10はその原理を図示したもので、図1-11はゲル電気泳動で分離後に銀染色を施したものである。近年は蛍光プライマーを

図1-9 PCR-reversed SSO法の原理

蛍光標識プライマーを用いたPCR産物

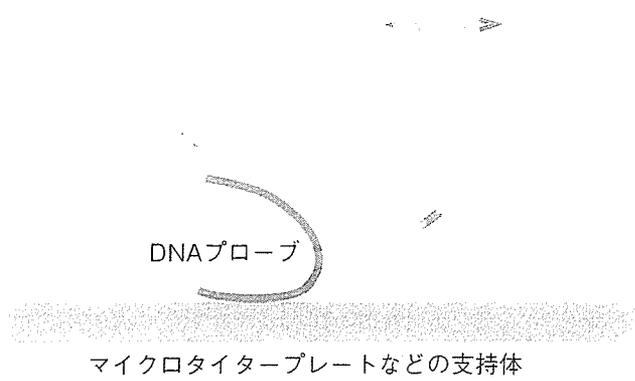


図1-10 PCR-SSCP法の原理

PCR産物→加熱変性：一本鎖DNA→非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

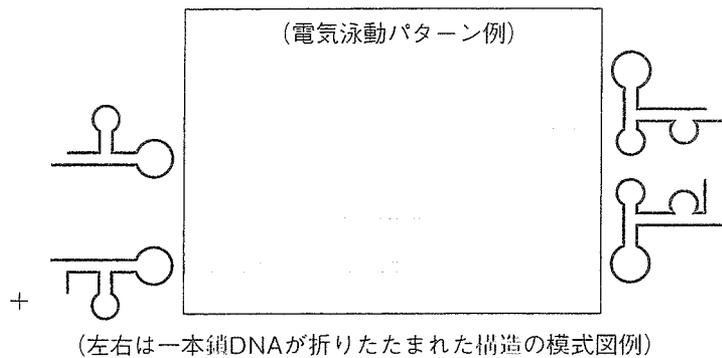
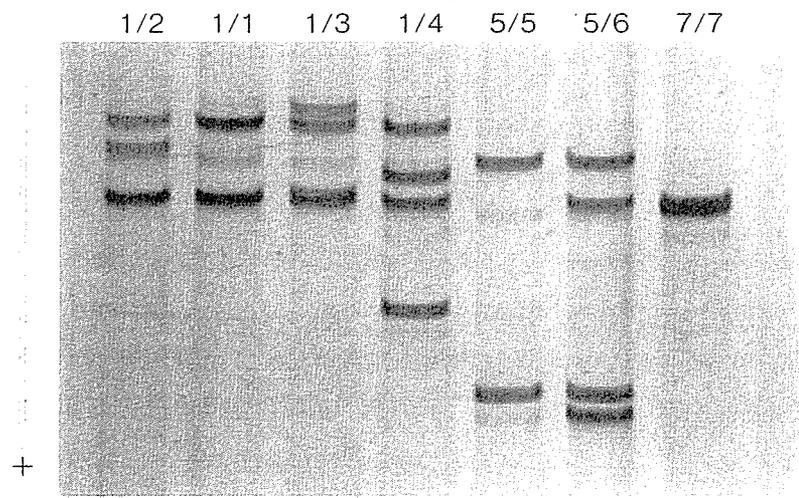


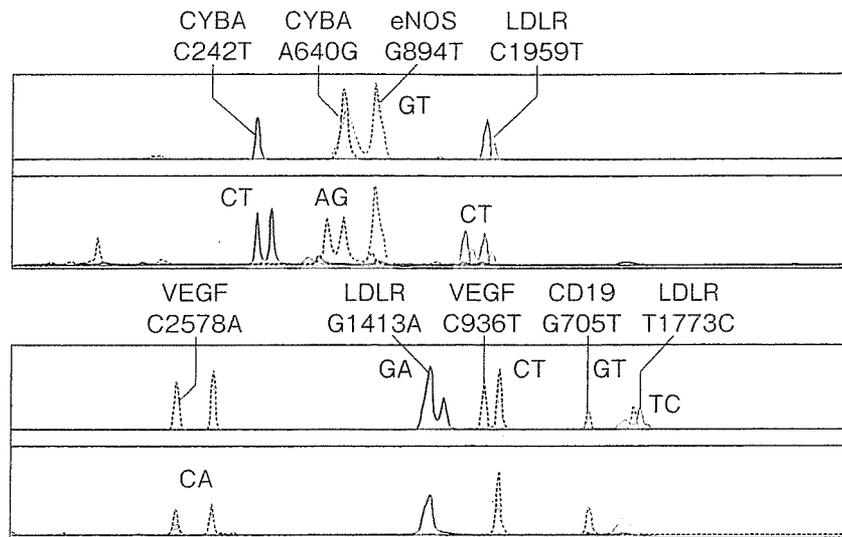
図1-11 ゲル電気泳動と銀染色を用いたPCR-SSCP法の例

(遺伝子型)



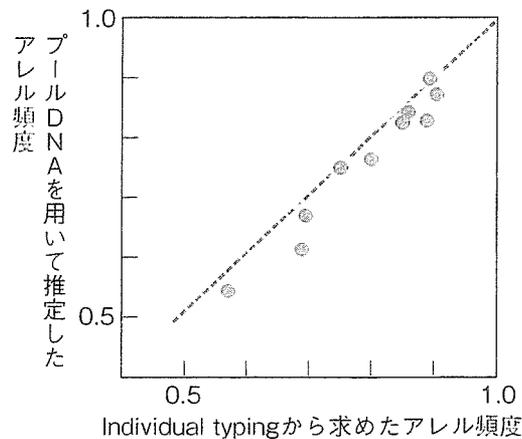
写真では多数の対立遺伝子が見られるが、SNPでは2種の対立遺伝子の組み合わせによる3種の遺伝子型が見られる。

図1-12 キャピラリー型自動シーケンサーと複数の蛍光標識プライマーを用いたPCR-SSCP法の例



出典 参考文献7) より引用改変

図1-13 プール試料からのSNP対立遺伝子頻度推定：自動シーケンサーを用いたSSCP法の例



出典 参考文献7) より引用改変

用いてPCRを行った産物をキャピラリー型自動シーケンサーで解析することにより処理能力を向上する考案もなされている (図1-12)<sup>6) 7)</sup>。多数の試料を等量ずつ混合したプール試料から、一挙にSNP対立遺伝子頻度を推定することも可能である (図1-13)<sup>6) 7)</sup>。また、標準二本鎖DNAと検体二本鎖DNAとでheteroduplexを作らせ、これをHPLC (high performance liquid chromatography) で検出する方法も開発されている。これらは既知のSNPsのタイピングとともに、未知のSNPsの検出にも利用できる方法である。

次に、SNP特異的プライマーによる伸長反応を行わせて検出する方法がある。従来よりASP (allele specific primer) 法あるいはSSP (sequence specific primer) 法が広く用いられてきた (図1-14)。TaqMan法はこの特異的伸長反応とFRET測定を組み合わせた方法である。さらに、一塩基の伸長産物を検出する方法として、MALDI-TOF/MS (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) 法を用いる方法があり、PCR-SSP産物を検出する一分子蛍光検出法がある (図1-15, 16)。

図1-14 PCR-SSP法の原理  
SNP特異的なプライマーを用いたPCR伸長反応を検出する

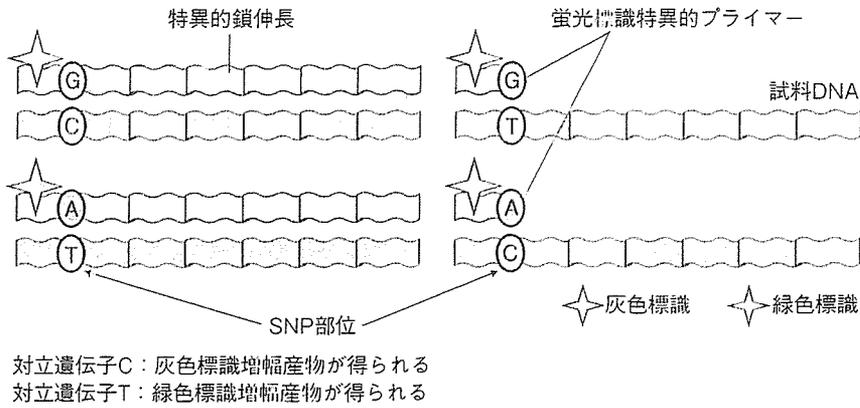
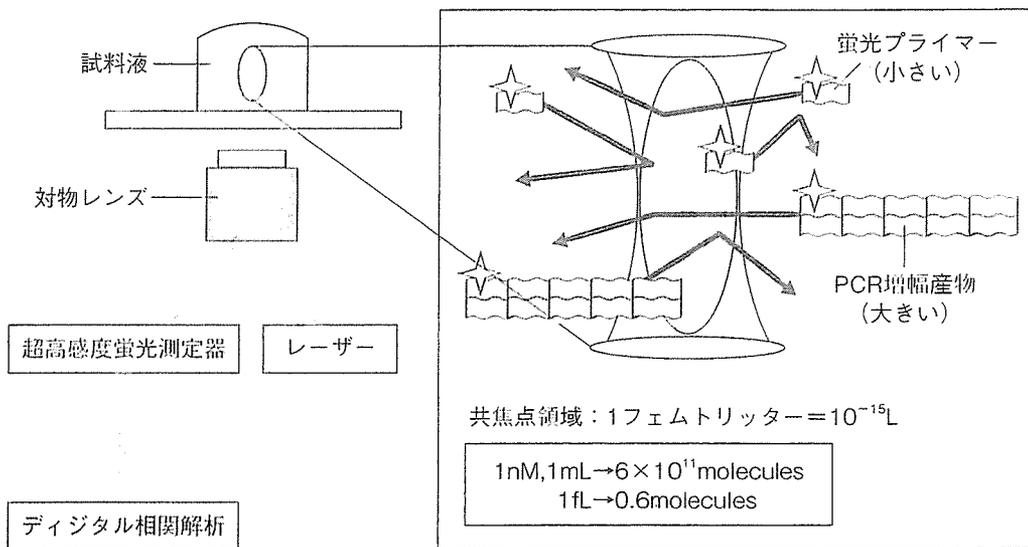
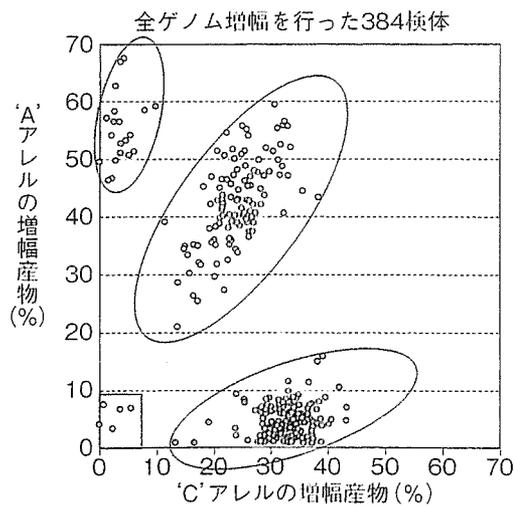


図1-15 SNP特異的PCRと一分子蛍光検出法（蛍光相関法）を組み合わせたSNPタイピング法



出典 参考文献8) より引用改変

図1-16 全ゲノム増幅試料を用いたSNPタイピングの例



出典 参考文献8) より引用改変

後者は蛍光相関分光法 (fluorescent correlation spectroscopy) を検出に用いる方法で、多数検体のタイピングに適する<sup>8)</sup>。さらには塩基配列決定によってSNPタイピングを実行することもあるが、現状ではコストと手間がかかるため、多数検体の解析には適さない。通常のシーケンサーを用いる方法以外にも、SNPを含む30塩基以内の配列を簡便に決定するPyrosequencing法がある。

### 3) 全ゲノム増幅技術

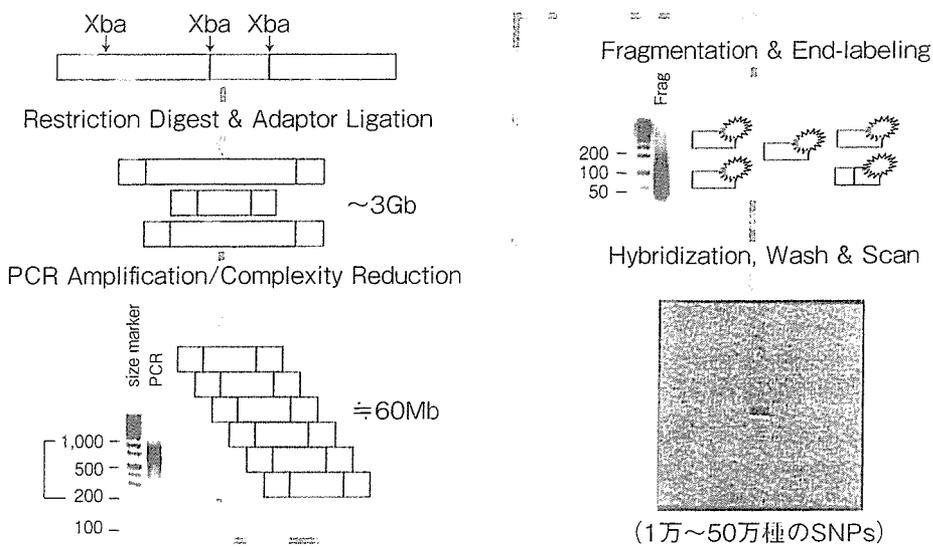
近年、微量あるいは保存状態の悪いゲノムDNAからゲノム全域をカバーする多量の増幅断片を生成する技術 (whole genome amplification) が開発されてきた<sup>9)</sup>。これはもともと、考古学的試料などの微量かつ損傷を受けた貴重なDNAを分析するために工夫された技術であるが、疾患関連遺伝子の探索研究において、限られた量の患者ゲノムDNAを用いて多数の遺伝子・ゲノム多型を解析する際にも有用である。PEP (primer preamplification) 法とDOP (degenerate oligonucleotide primer) 法が用いられてきたが、最近ではMDA (multiple displacement amplification) 法が増幅効率も高く、ゲノムのほとんどの領域をほぼ同等に増幅できる方法として評価されている。筆者らの経験でもほとんどのSNPについて増幅しないゲノムDNAを用いた場合と同じ結果が得られているので、実用上の問題はない。一方、マイクロサテライト多型については、全ゲノム増幅の際に繰り返しのずれ (slippage) が生じることがあり、増幅しないゲノムDNAを用いた場合との一致率が70%から95%程度と報告されているので、他に手段がない場合にのみ用いる方法だと考えられる。先に示した図1-16は全ゲノム増幅法と前述した一分子蛍光検出法を組み合わせ、384穴のマイクロタイタープレート上でSNPタイピングを行った例である<sup>8)</sup>。3つの遺伝子型のクラスターが明瞭に分離されている。

### 4) 大規模ゲノムワイドSNP解析技術

現在、ヒトのさまざまな多因子疾患にかかわる遺伝子を探索する戦略として最も注目を浴びているのがゲノムワイド関連解析法 (genomewide association analysis) である。このためには、多数の患者、対照者試料について、ゲノム全域に分布する数十万種類のSNPを解析しなければならないが、従来の技術ではコストおよび労力が膨大であった。最近、少なくとも2つのメーカーがより実用的な技術を開発した<sup>10) 11)</sup>。その1つ (Affymetrix社) では、まず制限酵素反応でゲノムDNAの断片化を行い、続いてそれら断片の両端にアダプター配列を付加し、それらをまとめて増幅した後に蛍光標識を施した後に、マイクロアレイを用いたアレル特異的なハイブリダイゼーションによりSNPタイピングを行う (図1-17)。現在では、この方法を用いて50万種を超えるSNPを同時にタイピングするキットが市販されている。筆者らはこのキットを用いるSNP解析システムを構築し、いくつかの多因子疾患についてゲノムワイド関連解析を実施している。その1例として、睡眠障害の1つであるナルコレプシーの結果の一部を紹介する。ヒトのナルコレプシーについては、すでに確立した感受性遺伝子として、6番染色体上のHLA-DQBI遺伝子が知られている。図1-18はHLA遺伝子領域について得られた結果であるが、期待どおりHLA-DQBI遺伝子近傍をピークとする強い関連が認められた (宮川卓ら未発表データ)。

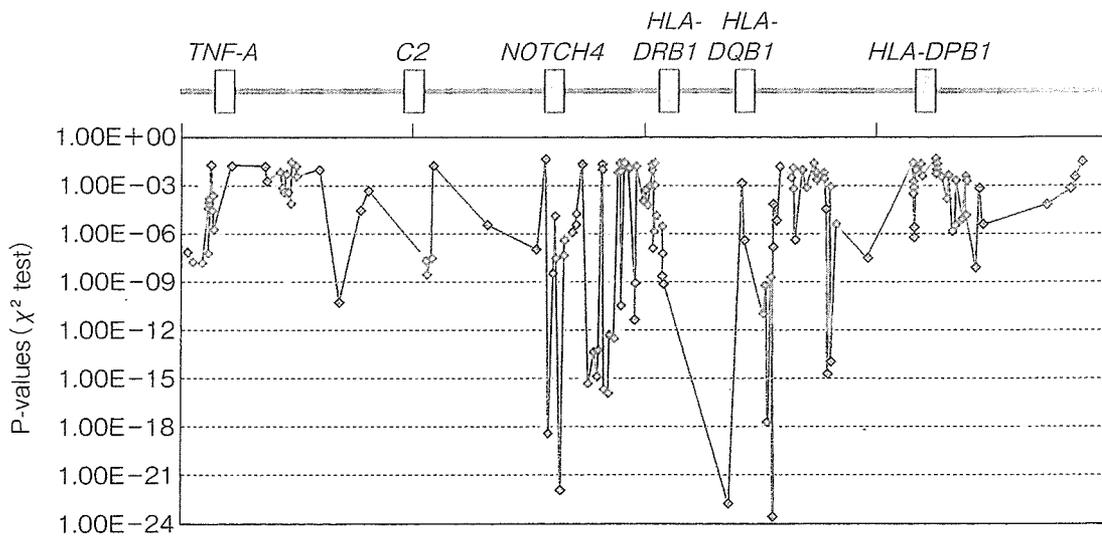
(徳永勝士)

図1-17 ゲノムワイド探索用SNPタイピングシステムの例



出典 参考文献10) より引用改変

図1-18 ヒトナルコレプシーにおけるHLA遺伝子領域のSNPを用いた関連解析の結果



(宮川卓ら未発表データ)

## 参考文献

- 1) Yokouchi Y, Nukaga Y, Shibasaki M, et al : Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12 B locus by a genome-wide search in Japanese families. *Genomics* **66** : 152-160, 2000
- 2) Wang L, Juji T, Tokunaga K, et al : Polymorphic microsatellite markers for the diagnosis of graft-versus-host disease. *N Engl J Med* **330** : 398-401, 1994
- 3) Noguchi E, Yokouchi Y, Zhang J, et al : Positional identification of an asthma susceptibility gene on human chromosome 5q33. *Am J Respir Crit Care Med* **172** : 183-188, 2005
- 4) Kawashima M, Tamiya G, Oka A, et al : Genome-wide association analysis of human narcolepsy and a new resistance gene. *Am J Hum Genet* **79** : 252-263, 2006
- 5) 辻本繁三, 田中利男 編 : ゲノム研究実験ハンドブック. 羊土社, 東京, 2004
- 6) 馬場直吾, 林健志 : SNPsとは何か? 「ゲノム医学がわかる」 菅野純夫 編, 羊土社, 東京, 32-39, 2001
- 7) Doi K, Doi H, Noiri E, et al : High-throughput single nucleotide polymorphism typing by fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis with capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **25** : 833-838, 2004
- 8) Bannai M, Higuchi K, Akesaka T, et al : Single-nucleotide-polymorphism genotyping for whole-genome-amplified samples using automated fluorescence correlation spectroscopy. *Anal Biochem* **327** : 215-221, 2004
- 9) Hughes S, Lasken R (eds) : Whole genome Amplification. Scion Publishing, 2005
- 10) Matsuzaki H, Loi H, Dong S, et al : Parallel genotyping of over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array. *Genome Res* **14** : 414-425, 2004
- 11) Oliphant A, Barker DL, Stuelpnagel JR, et al : BeadArray technology : enabling an accurate, cost-effective approach to high-throughput genotyping. *Biotechniques* **32** : S56-S61, 2002