

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（I）

## 目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功 刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非品質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉 岡 澄 江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究	合 田 幸 広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工 藤 由 起 子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能 美 健 彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉 里 勝 利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜 山 行 雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎 藤 嘉 朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山 口 照 英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 謙 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川 崎 ナ ナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内 田 恵 理 子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純 一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永 井 洋 士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網 脇 祥 子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍 兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名 和 行 文 …… 576



## 患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及び メタボロミクスの手法の開発に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部  
研究者 齋藤 嘉朗

研究要旨 *CYP3A4\*16*及び*CYP2D6\*10*, *\*36*につき、基質特異性を含め、多型の機能影響を詳細に明らかにした。6 遺伝子の重要多型につきタイピング系を開発した。*CYP3A* を誘導する薬剤群投与の有無をラット尿のメタボノミクス解析により識別した。

### 分担研究者

- (1) 東洋紡績(株)敦賀バイオ研究所 宝田 裕
- (2) 第一化学薬品(株)診断薬研究所 森 篤雄
- (3) 三菱ウェルファーマ(株)創薬研究本部  
薬物動態研究所 丹羽 卓朗
- (4) ファイザー(株)中央研究所 岩崎 一秀

### A. 研究目的

薬物に対する生体の反応性(薬物応答性)に関しては、個体差や人種差があることがよく知られている。薬物動態関連分子をコードする遺伝子の多型によりもたらされる機能変化は、薬物の血中濃度の過度の低下や上昇を招き、個体差発現の原因となりうる。既に多数の遺伝子多型が薬物動態関連遺伝子において報告されているものの、機能変化が明らかにされているものは比較的少ない。本研究では、遺伝子型タイピングの対象とすべき遺伝子多型を明らかにする目的で、薬物の有効性および副作用発現に影響を及ぼす薬物代謝酵素及びトランスポーター等の遺伝子多型を、インビトロ機能解析系を用いて明らかにする。また、同時に、これら遺伝子多型の一斉タイピング系を開発する。さらに、遺伝子多型による予測が困難な場合の薬物応答性の個体差を予測する目的で、メタボノミクスの手法も取り入れて、環境要因により変化する薬物動態指標となるバイオマーカーを明らかにする。本研究の遂行により、患者毎の薬物代謝酵素及びトランスポーターの活性予測が容易となり、個人の体質に見合った適切な医薬品の選択・投与量の決定のための重要な情報を得ることが可能となる。

今年度は*CYP3A4\*16*多型のインビトロ機能解析のため、昆虫細胞を用いた大量酵素発現系を確

立し、5基質につき酵素反応への影響を解析した。またアジア人で頻度の高い*CYP2D6\*10*及び*\*36*多型につき、2種の基質の代謝に対する影響をインビトロで検討した。さらに薬物代謝、薬物動態、及びその発現誘導に関わる4種の遺伝子につき、タイピング系を開発を行った。また*CYP3A*の活性指標と成り得る尿中バイオマーカーを探索する目的で、肝臓における*CYP3A*の発現レベルを測定できるラットを用いて、2種の*CYP3A*誘導剤投与の有無をメタボノミクス解析により分類する方法を確立した。

### B. 研究方法

#### ①遺伝子多型のインビトロ機能解析

##### 1) *CYP3A4*

##### a) 酵素蛋白質の発現

発現は、Bac-to-Bac bacuovirus Expression System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて、昨年度構築した組換えウィルスストックを使用して行った。組換えバキュロウィルスは、ヒト野生型*CYP3A4* cDNAまたは*CYP3A4\*16* cDNA、及びヒトNADPH-P450還元酵素(OR) cDNAを共発現しうるものを調製した。またORのみを発現する組換えバキュロウィルスも同様に調製した。宿主細胞種は、HighFive細胞及びSf21細胞につき、検討した。これらの細胞にMultiplicity of Infection (MOI) = 1.0または4.0でウィルスストックを感染させ、24時間後にクエン酸鉄とδ-アミノレブリン酸を加え、さらに48時間培養し、細胞を回収後、ミクロソーム画分の調製を行った。

還元型CO差スペクトルの測定はOmuraとSatoの方法(J. Biol. Chem., 239, 2370-2378 (1964))



に従って行い、得られた 450 及び 490 nm の吸光度差より吸光度係数  $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  を用いて CYP (ホロ蛋白質) 含量を算出した。OR の活性としては、シトクロム C の還元活性を 550 nm の吸光度の増加により測定し、吸光度係数は  $19.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  とした。OR 含量はヒト OR の比活性を  $3.0 \text{ nmol cytochrome C reduced/min/nmol purified human OR}$  (Nakajima et al, J. Pharmaceutical Sci., 91, 952-963, (2002)) とし、算出した。

CYP3A4 ホロ+アポ蛋白及び OR 蛋白の発現は、イムノブロット法により確認した。すなわち、マイクロソーム画分につき、一次抗体として、ヤギ抗 CYP3A4 抗血清 (第一化学薬品株、東京) またはヤギ抗 OR 抗血清 (第一化学薬品株) を、二次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Lab. West Grove, PA, USA) を用いた。

#### b) 酵素活性の測定

以下の 5 基質につき解析した。

b-1) Luciferin BE : P450-Glo™ Assays (Promega Corporation, Madison, WI, USA) を用いて添付のマニュアルに従い、CYP3A4 特異的なルシフェリン前駆分子である Luciferin BE を基質として、酵素活性により変換されたルシフェリンによる発光量を定量した。

b-2) ミダゾラム (MDZ) : 2 通りの方法で行った。

b-2-a) Cytochrome b5 添加 : 基質濃度は  $0.2\text{-}200 \mu\text{M}$ 、マイクロソーム添加量は CYP3A4 野生型または \*16 型酵素を  $10 \text{ pmol P450/mL}$  とした。あらかじめマイクロソームを Cytochrome b5 精製蛋白 ( $80 \text{ nM}$ ) と混和し、 $37^\circ\text{C}$  で 5 分間プレインキュベートした後、反応液に添加した。 $37^\circ\text{C}$  で 5 分間反応後、反応液中の代謝物 (1'-水酸化体、4-水酸化体) を LC/MS/MS にて定量した。

b-2-b) Cytochrome b5 非添加 : 基質濃度は  $0.03\text{-}300 \mu\text{M}$ 、マイクロソーム添加量は CYP3A4 野生型または \*16 型酵素を  $0.75 \text{ pmol P450/mL}$  とした。 $37^\circ\text{C}$  で 5 分間プレインキュベートした後、NADPH を加えて反応を開始した。 $37^\circ\text{C}$  で 4 分間反応後、反応液中の代謝物 (1'-水酸化体) を LC/MS/MS にて定量した。

b-3) カルバマゼピン (CBZ) : 基質濃度は  $10\text{-}500 \mu\text{M}$ 、マイクロソーム添加量は CYP3A4 野生型または \*16 型酵素を  $10 \text{ pmol P450/mL}$  とした。あらかじめマイクロソームを Cytochrome b5 精製蛋白 ( $80 \text{ nM}$ ) と混和し、 $37^\circ\text{C}$  で 5 分間プレインキュベートした後、反応液に添加した。 $37^\circ\text{C}$  で 20 分間反応後、

反応液中の代謝物 (10, 11-エポキシ体) を LC/MS/MS にて定量した。

b-4) テストステロン (TSR) : 基質濃度は  $2.5\text{-}500 \mu\text{M}$ 、マイクロソーム添加量は CYP3A4 野生型または \*16 型酵素を  $1.5 \text{ pmol P450/mL}$  とした。 $37^\circ\text{C}$  で 5 分間プレインキュベートした後、NADPH を加えて反応を開始した。 $37^\circ\text{C}$  で 10 分間反応後、反応液中の代謝物 (6 $\beta$ -水酸化体) を LC/MS/MS にて定量した。Cytochrome b5 は添加しなかった。

b-5) テルフェナジン (TFD) : 基質濃度は  $0.03\text{-}300 \mu\text{M}$ 、マイクロソーム添加量は CYP3A4 野生型または \*16 型酵素を  $1.5 \text{ pmol P450/mL}$  とした。 $37^\circ\text{C}$  で 5 分間プレインキュベートした後、NADPH を加えて反応を開始した。 $37^\circ\text{C}$  で 10 分間反応後、反応液中の代謝物 ( $\alpha$ -ブチル水酸化体) を LC/MS/MS にて定量した。Cytochrome b5 は添加しなかった。

#### 2) CYP2D6

CYP2D6\*10 及び \*36 は、アジア人で  $0.2\text{-}0.5$  という高頻度で見られ、両者とも活性低下が示されている。さらに近年では、\*36-\*10 とタンデムに並んだ構造が、半数以上を占めていることが報告されている。従って、基質によるそれぞれの活性低下の度合いにつき解析することは重要である。

#### a) 酵素蛋白質の発現

pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングした野生型 CYP2D6 cDNA につき、QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を用いて変異を導入し、CYP2D6\*10 及び \*36 の cDNA を構築した。これらを鋳型として、両端に Hind III サイトを有するプライマーで増幅した cDNA 断片を精製後、発現ベクター (酵母 OR cDNA を組込み済み) へ Hind III サイトを用いて挿入した。酵母細胞の形質転換は酢酸リチウム法により行い、順次スケールアップして、最終的に  $1.8 \text{ L}$  の液体培養よりマイクロソーム画分を調製した。

マイクロソーム画分につき、還元型 CO 差スペクトルの測定を Omura と Sato の方法に従って行い、CYP 含量 (ホロ酵素量) を算出した。また CYP2D6 の発現レベル (ホロ+アポ酵素量) は、マイクロソーム画分につき、抗 CYP2D6 モノクローナル抗体 (BD Gentest) 及び HRP 標識ヒツジ抗マウス Ig 抗体 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて、イムノブロット法により解析した。

#### b) 酵素活性の測定

以下の 2 基質につき解析した。なお、



Michaelis-Menten 式及 Eadie-Hofstee 式による速度論的解析 ( $K_m$  値及び  $V_{max}$  値の算出)は、Prism (Ver. 4.0)を用いて行った。

b-1) メキシレチン (MXL) : MXL の CYP2D6 代謝物である *p*-水酸化体及び 2-水酸化体の定量は、Nakajima らの方法 (Br. J. Clin. Pharmacol., 46, 55-62 (1998)) を改変しておこなった。即ち、2 - 200  $\mu$ M の MXL 等を含む反応液を 37°C で 1 分間加温した後、野生型では 400  $\mu$ g、\*10 では 600  $\mu$ g、\*36 では 1.2 mg のマイクロソーム画分を加えて反応を開始し、さらに 20 分間インキュベートした。反応液を遠心、ろ過後、高速液体クロマトグラフィーによる分析に供した。溶出物は励起 270 nm、発光 312 nm の蛍光強度により検出した。

b-2) ブフラロール (BFL) : BFL の 1'-水酸化反応は、Hanioka らの方法 (Drug Metab. Dispos., 30, 391-396 (2002)) に従って行った。

## ②タイピング系開発・評価

### 1) パイロシーケンシング法によるタイピング系の開発

イリノテカンの活性代謝物 SN-38 等を輸送し、その体内動態に関わる薬物トランスポーター *ABCG2*、*UGT1A1* 等の薬物動態関連分子の発現誘導に関与する転写因子 Nrf2 をコードする *NFE2L2*、その細胞内発現量を制御する *KEAPI* を対象とした。これら 3 遺伝子で見いだされた遺伝子多型を用いて解析されたハプロタイプのうち、頻度 3-5%以上のものを同定するためのタグ多型につき、パイロシーケンシング法によるタイピング系を開発した。なお、*ABCG2* は連鎖不平衡解析の結果から、3つの Block (Block -1, 1, 2) に分けてハプロタイプが報告されている (Maekawa et al., Drug Metab. Pharmacokinet., 21, 109-121 (2006))。対象とした多型は、*ABCG2* では、-1203\_-1200delCTCA (Block -1)、IVS6-217A>G (Block 1)、IVS9-60A>T、IVS11+20A>G、IVS14-46A>G (Block 2)、*NFE2L2* では-1123A>G、-769G>A、-767G>A、-733C>A、2229 (\*411)T>G、*KEAPI* では-3088C>G、1413C>G (Leu471Leu)、1611C>T (Tyr537Tyr)、2324 (\*449)G>A、の計 14 多型である。なお、*ABCG2* Block 1 のタグ多型には 34G>A (V12M) 及び 421C>A (Q141K) も含まれるが、これらについては昨年度の本研究報告書に記載した。

まず各多型部位を含む断片をゲノム DNA (12.5-20 ng、日本人樹立細胞株由来) より特異的に PCR 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 産物を Streptavidin ビーズ (GE Healthcare) と 10 分間インキュベートして結合させ、フィルタープレートに移した。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 穴専用プレート (Biotage AB, Uppsala, Sweden) に移した。シーケンシングプライマー (10 pmol/分) を加え、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。これにつき、ミニシーケンシング反応を行い、塩基配列を解読して多型を解析した。

### 2) NAP (Nuclease Activated Probe)-ligation 法と DNA チップ検出を組み合わせたタイピング法の開発

対象遺伝子は、多くの薬物の代謝に関与し、また活性変化を示す多型が日本人で報告されている *CYP2C9*、*CYP2C19*、*CYP2D6* とし、対象多型は、*CYP2C9*\*3 (1075A>C)、*CYP2C19*\*2 (681G>A)、\*3 (636G>A)、*CYP2D6* 2850C>T、\*4 (1846G>A)、\*5 (whole deletion)、100C>T、\*14 (1758G>A)、\*18 (4125\_4133dupGTGCCCACT)、\*21 (2573\_2574insC)、-1584C>G、duplication の 12 種類とした。なお、本法の検討に用いた DNA は、書面にてインフォームドコンセントを取得したボランティア検体から抽出したものである。

タイピング方法は、まず Multiplex-PCR で増幅した産物に、多型部位に特異的な配列を 3' 末端に有し、各アレルに特異的な蛍光色素を標識した 2 本のアレル特異プローブと、その 3' 下流に隣接してハイブリし、5' 末端の 1 塩基が、多型部位で mismatches を有する共通プローブをハイブリさせる。プローブがハイブリすると DNA ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性が、特異プローブの 3' 末の配列特異的に、共通プローブの mismatches 部位を切断し、切断により生成されたリン酸基と、特異プローブの 3' 末端をリガーゼで結合させる。この NAP-ligation 反応により、多型特異的にプローブの連結が起こる。多型特異的に連結されたプローブは、遺伝子特異的なプローブを結合させた DNA チップで検出し、連結したプローブの蛍光色素の色により、一度に 12 種類の多型タイピングを行うことが可能である。

### ③バイオマーカー探索



## 1) CYP3A 誘導実験

Sprague-Dawley ラットに、pregnane X 受容体 (PXR) リガンドで CYP3A1 などの誘導剤である PCN (pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile) 及びデキサメサゾン、それぞれ 75 mg/kg 及び 100 mg/mL をコーンオイルに懸濁し、3 日間腹腔内投与した。対照群にはコーンオイルのみを投与した。3 日目の投与直後に、ラットをメタボリック・ケージに入れ、絶食下で 24 時間採尿した。尿は遠心後、測定まで -30°C で保存した。最終投与 24 時間後に、肝臓を約 0.1 g を採取し、定法に従い mRNA 測定用試料を調製し、測定まで -80°C で保存した。CYP3A1 の mRNA 発現量はリアルタイム RT-PCR 法で測定した。発現量の比較は Comparative Ct method に従い、補正には rRNA を用いた。なお、誘導実験は、まず第 1 回目として、PCN 投与群及びコントロール群各 6 匹ずつで行い、次に第 2 回目として、PCN 投与群、デキサメサゾン投与群、コントロール群各 3 匹ずつで行った。

## 2) 尿の分析

尿を水で 5 倍に希釈し、以下の条件でクロマトグラムを得た。測定は、各検体 2 回ずつ行った。

### HPLC 条件

装置：ACQUITY UPLC システム (Waters

Corporation, New Castle, Delaware, USA)

カラム：Waters Aquity C18, 2.1 mm x 100 mm

(Waters Corporation)

注入量：5  $\mu$ L

### TOF-MS 条件

装置：Waters Micromass LCT Premier (Waters Corporation)

イオン化：ESI(+, -)

測定範囲：50-850 m/z V モード

コーン電圧：50V, キャピラリー電圧 3000V

スキャンタイム：0.4 sec

質量補正標準サンプル：Leucine Enkephalin

## 3) 主成分分析

主として保持時間 0~7.7 分のクロマトグラム・データから、MarkerLynx (Waters Corporation) を用いて、単位保持時間当たり強度の強いものから 20 個の質量をマーカー (保持時間と質量数のセット) として拾い上げ、主成分分析の対象とした。主成分分析は、Simca-P+10.5 (Umetrics AB, Umea, Sweden) で行った。

## ④倫理面への配慮

「①遺伝子多型のインビトロ機能解析」研究は、既知の遺伝子多型に関するインビトロ機能解析のため、倫理面での問題は生じないと考えられる。

「②タイピング系開発・評価」の研究の一部は、ヒトゲノム DNA を用いた研究である。従って、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、倫理審査委員会の承認のもとに行った。

「③バイオマーカー探索」はラットを用いた研究であるため、「動物の愛護及び管理に関する法律」および総理府告示「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」を遵守し、最小匹数を用い、かつできる限り苦痛を与えないよう配慮して行った。

## C. 研究結果

### ①遺伝子多型のインビトロ機能解析

#### 1) CYP3A4

##### a) 酵素蛋白質の発現

宿主細胞として High Five 細胞または Sf21 細胞を用いて、CYP3A4 と OR を共発現した昆虫細胞ミクロソーム画分につき、還元型 CO 差スペクトルを測定したところ、Sf21 細胞を用いた方が High Five 細胞を用いた場合と比較して、野生型及び変異型ともに、mg 蛋白あたり約 2 倍の P450 発現量を示した。一方、OR 活性は、宿主細胞にかかわらず、野生型及び変異型、OR 単独発現系ともに、同程度の活性を有していた。さらに、High Five 細胞で OR のみを単独発現させた場合、イムノブロットングで低分子量にもバンドが認められ、組換え蛋白が分解していると考えられた。これらのことから、バキュウウイルス感染の宿主細胞として、Sf21 細胞を選択した。

次に、Sf21 細胞を用いて、感染時間 (48, 62, 72 時間) 及び MOI (1.0 または 4.0) の検討を行った。CYP3A4 及び OR の発現について、イムノブロットングで解析したところ、CYP3A4、OR ともに、MOI = 4.0 で 72 時間感染させた場合が、最も高い発現量を示した。従って、組換え蛋白発現の条件としては、Sf21 細胞に MOI=4.0 でウイルスストックを感染させ、72 時間後に細胞を回収する条件に決定した。

上記条件に従い、CYP3A4 及び OR を共発現する昆虫細胞ミクロソームを 3 ロット調製し、活性測定用とした。P450 発現量は野生型酵素が 82-105 pmol P450/mg protein であり、\*16 型酵素が 127-154 pmol P450/mg protein であった。OR 活性は野生型、\*16 及び OR 単独発現系ともに、424-697 nmol/min/mg protein の範囲にあった。OR と P450 発現量のモル比は、野生型が 1.6-2.8、

\*16 が 1.2-1.5 と算出された。また、イムノブロットティングで、野生型と\*16 のホロ+アポ蛋白の発現量に差は見られなかった。

b) 活性測定

b-1) Luciferin BE : 野生型及び\*16 の酵素活性を Glo assay により測定した。代謝物生成に対する P450 量の直線性は野生型、\*16 型酵素ともに 2.0 pmol まで認められた。また Cytochrome b5 の添加は、野生型、変異型ともに Cytochrome b5 非添加の場合と比較して、活性を 2 倍以上増加させた。調製した 3 ロットの酵素活性を、①発現マイクロソーム画分のみ、②OR 単独発現マイクロソーム添加、③精製 Cytochrome b5 添加、④OR 単独発現マイクロソーム及び精製 Cytochrome b5 添加、の 4 条件で測定し、野生型と\*16 型酵素で比較した(図 1)。\*16 の酵素活性は、すべての条件下において、野

生型の 15-20%に低下した。

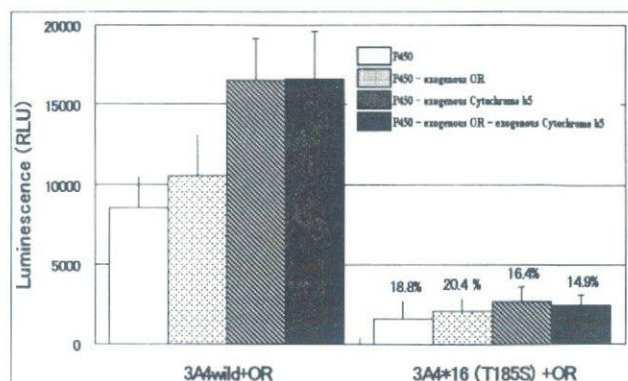


図 1. 野生型及び\*16 型 CYP3A4 酵素の Luciferin BE 代謝活性に対する外因性 OR 及び外因性 Cytochrome b5 添加の効果

表 1. CYP3A4 野生型及び\*16 型酵素におけるミダゾラム代謝活性 (Cytochrome b5 存在下)

		1'-OH MDZ			4-OH MDZ		
		Km ( $\mu\text{mol/L}$ )	Vmax ( $\text{pmol/min/pmol P450}$ )	Vmax / Km ( $\mu\text{L/min/pmol P450}$ )	Km ( $\mu\text{mol/L}$ )	Vmax ( $\text{pmol/min/pmol P450}$ )	Vmax / Km ( $\mu\text{L/min/pmol P450}$ )
OR	Lot 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Lot 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Lot 3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	mean $\pm$ S.D.	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CYP3A4 wild-type+OR	Lot 1	0.88	12.9	14.6	22.2	7.5	0.34
	Lot 2	0.91	14.7	16.1	21.5	8.1	0.37
	Lot 3	0.92	14.2	15.4	22.7	7.8	0.34
	mean $\pm$ S.D.	0.91 $\pm$ 0.02	13.9 $\pm$ 0.9	15.4 $\pm$ 0.7	22.2 $\pm$ 0.6	7.8 $\pm$ 0.3	0.35 $\pm$ 0.02
CYP3A4*16+OR	Lot 1	1.7	8.5	5.1	34.2	6.2	0.18
	Lot 2	1.4	12.3	8.8	29.1	8.9	0.31
	Lot 3	1.4	10.5	7.4	33.6	7.4	0.22
	mean $\pm$ S.D.	1.5 $\pm$ 0.1*	10.4 $\pm$ 1.9*	7.1 $\pm$ 1.9**	32.3 $\pm$ 2.8*	7.5 $\pm$ 1.3	0.24 $\pm$ 0.06*

ND : not detected.

Kinetic parameters were determined by the Michaelis-Menten equation.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs wild-type (Student's t-test).

表 2. CYP3A4野生型及び\*16型酵素における代謝活性 (Cytochrome b5非存在下)

CYP3A marker reaction	Type	$K_m$	$V_{max}$	$CL_{int}$
		$\mu M$	$\text{pmol/min/pmol CYP}$	$\mu\text{L/min/pmol CYP}$
Midazolam 1'-hydroxylation	Wild	2.2 $\pm$ 0.3	9.8 $\pm$ 0.3	4.5
	*16	8.3 $\pm$ 1.4	8.0 $\pm$ 0.4	1.0
Testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation	Wild	32 $\pm$ 8	28 $\pm$ 2	0.88
	*16	47 $\pm$ 7	20 $\pm$ 1	0.43
Terfenadine t-butylhydroxylation	Wild	0.18 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.01	4.2
	*16	0.25 $\pm$ 0.06	0.37 $\pm$ 0.02	1.5

Kinetic parameters were calculated by a nonlinear regression analysis using the computational program (GraphPad Prism 4.02, GraphPad Software).

Data of  $K_m$  and  $V_{max}$  represent the mean  $\pm$  S.E. of triplicate determinations.



b-2) ミダゾラム (MDZ) : MDZ は CYP3A4 により 1'-水酸化ミダゾラム (1'-OH MDZ) および 4-水酸化ミダゾラム (4-OH MDZ) に代謝される。Cytochrome b5 存在下では、1'-OH MDZ の生成において MDZ 高濃度で代謝活性が減少する substrate-inhibition 様の傾向を認めたがその程度は弱いため、1'-OH MDZ および 4-OH MDZ の生成とも Michaelis-Menten の式に従い、非線形最小二乗法にて  $K_m$  値および  $V_{max}$  値を算出した。\*16 型酵素では野生型に比し、1'-水酸化反応では、 $K_m$  値の約 65% 上昇、 $V_{max}/K_m$  値の約 54% 低下を、4-水酸化反応では、 $K_m$  値の約 45% 上昇、 $V_{max}/K_m$  値の約 31% 低下を認めた (表 1)。一方、 $V_{max}$  値については、1'-水酸化反応では約 25% の低下が見られたが、4-水酸化反応では有意な変化は認められなかった。1 ロットを用いた結果であるが、Cytochrome b5 非存在下、1'-OH MDZ の生成を検討した場合でも、同様の傾向が認められた (表 2)。

b-3) カルバマゼピン (CBZ) : CBZ は CYP3A4 によりカルバマゼピン 10, 11-エポキシド (CBZE) に代謝される。Cytochrome b5 存在下、反応を行ったところ、CBZE の生成はシグモイド型を示したため、Nakamura ら (Nakamura et al., Drug Metab. Dispos. 31, 432-438 (2003)) の modified two-site equation ( $V_{max1}=0$ ) に従い、非線形最小二乗法にて  $K_{m1}$  値、 $K_{m2}$  値および  $V_{max2}$  値を算出した。\*16 型酵素では野生型に比し、 $K_{m2}$  値の約 106% 上昇、 $V_{max2}$  値の約 47% 低下および  $V_{max2}/K_{m2}$  値の約 74% 低下を認めた。

b-4) テストステロン (TSR) : TSR は CYP3A4 により 6 $\beta$ 位が水酸化を受ける。Cytochrome b5 非存在下、反応を行ったところ、1 ロットを用いた結果であるが、\*16 型酵素では野生型に比し、 $K_m$  値の約 47% 上昇、 $V_{max}$  値の約 29% 低下、 $V_{max}/K_m$  値の約 51% 低下を認めた (表 2)。

b-5) テルフェナジン (TFD) : TFD は CYP3A4 により *t*-butyl 位が水酸化を受ける。Cytochrome b5 非存在下、反応を行ったところ、1 ロットを用いた結果であるが、\*16 型酵素では野生型に比し、 $K_m$  値の約 39% 上昇、 $V_{max}$  値の約 51% 低下、 $V_{max}/K_m$  値の約 64% 低下を認めた (表 2)。

## 2) CYP2D6

### a) 酵素蛋白質の発現

CYP2D6 の野生型、\*1*Q*、\*36 蛋白質 (それぞれ CYP2D6.1, CYP2D6.10, CYP2D6.36 と表示) につき、まず発現量の解析を行った。イムノブロッティングにより検討したホロ+アポ蛋白質発現量は、CYP2D6.1 を 100% とすると、CYP2D6.10 は 30%、

CYP2D6.36 は 33% であった。一方、還元型 CO 差スペクトルにより定量したホロ蛋白質発現量は、同じく野生型を 100% とすると、CYP2D6.10 は 6.1%、CYP2D6.36 は 3.7% であった。従って、両異型蛋白質では、酵素活性を有するヘム蛋白質の生成が大幅に低下していることが示唆された。

### b) 酵素活性の測定

b-1) メキシレチン (MXL) : MXL は CYP2D6 により、*p*-水酸化及び 2-水酸化されるため、その両代謝物を定量した。まず基質濃度 100  $\mu$ M の場合、ミクロソーム蛋白当たりの活性は、CYP2D6.1 におけるそれぞれの水酸化反応の値を 100% とすると、*p*-水酸化及び 2-水酸化ともに、CYP2D6.10 では約 6%、CYP2D6.36 では約 0.5% であった。一方、ホロ蛋白当たりの活性では、*p*-水酸化及び 2-水酸化ともに、CYP2D6.10 では CYP2D6.1 と有意な差は認められなかったが、CYP2D6.36 では約 10-20% に低下した。

次に、速度論的な解析を行った。その結果のまとめを表 3 に示した。なお、CYP2D6.36 の活性は非常に低く、このような解析は適用できなかったため、CYP2D6.1 の値と CYP2D6.10 の値を比較した。まず  $K_m$  値に関しては、CYP2D6.1 の場合に比して、*p*-水酸化反応では CYP2D6.10 で約 1.7 倍の上昇が見られたが、2-水酸化反応では有意な変化は認められなかった。 $V_{max}$  値では、ミクロソーム蛋白当たりの CYP2D6.10 における値は、両水酸化反応とも野生型の約 6.5% であり、 $V_{max}/K_m$  値は 5% 以下となった。一方、ホロ蛋白当たりの  $V_{max}$  値及び  $V_{max}/K_m$  値は、両反応とも CYP2D6.1 と CYP2D6.10 の間で有意な差は認められなかった。

b-2) プフラロール (BFL) : 次に、CYP2D6 の代表的な基質である  $\beta$ -遮断薬 BFL につき、その 1'-水酸化反応の速度論的解析を行った。まず  $K_m$  値では、CYP2D6.1 の場合に比して、CYP2D6.10 で約 2.8 倍、CYP2D6.36 で約 13.6 倍の有意な上昇が見られた。ミクロソーム蛋白当たりの  $V_{max}$  値では、野生型に比して CYP2D6.10 で約 13%、CYP2D6.36 で約 2.1% に低下し、 $V_{max}/K_m$  値はそれぞれ約 5%、約 0.2% となった。一方、ホロ蛋白当たりでの  $V_{max}$  値及び  $V_{max}/K_m$  値は、CYP2D6.10 の場合、CYP2D6.1 との間で有意な差は認められなかった。しかし CYP2D6.36 の場合は、 $V_{max}$  値は約 62% に、 $V_{max}/K_m$  値は約 5% に、それぞれ野生型に比べて低下した。

表3 野生型及び変異型 CYP2D6 発現マイクロソームを用いたメキシレチン水酸化反応の速度論的解析

	$K_m^a$	$V_{max}$		$V_{max}/K_m$	
		Protein <sup>b</sup>	CYP <sup>c</sup>	Protein <sup>d</sup>	CYP <sup>e</sup>
<b>p-Hydroxylation</b>					
CYP2D6.1	13.5±0.5	177±34	4.36±0.80	13.0±2.4	0.32±0.05
CYP2D6.10	23.1±2.0*	11.8±1.4*	5.72±1.56	0.51±0.03*	0.25±0.07
CYP2D6.36		<0.10	<0.01		
<b>2-Hydroxylation</b>					
CYP2D6.1	13.0±1.9	323±69	7.98±1.68	24.4±1.8	0.60±0.07
CYP2D6.10	18.4±3.9	19.9±1.6*	9.62±2.49	1.14±0.14*	0.56±0.19
CYP2D6.36		<2.00	<0.20		

Each value represents the mean ± S.E.M. of three separate experiments derived from independent preparations.

<sup>a</sup>μM.

<sup>b</sup>pmol/min/mg protein.

<sup>c</sup>pmol/min/pmol CYP2D6.

<sup>d</sup>μl/min/mg protein.

<sup>e</sup>μl/min/pmol CYP2D6.

\*Significantly different from CYP2D6.1 ( $p < 0.05$ ).

## ② タイピング系開発・評価

### 1) パイロシーケンシング法によるタイピング系の開発

日本人由来ヒト培養細胞 12 株のゲノム DNA を用いて、開発したパイロシーケンシング法による 14 遺伝子多型のタイピングを試みたところ、全ての多型・細胞株につき明瞭なタイピング結果が得られた。ABCG2 の 2 多型の結果を例として、図 2 に示した。なお、ABCG2 の -1203\_-1200delCTCA 多型では、変異型ホモの検体で、本来は見られないはずの最後から 2 番目及び 3 番目の C 及び T のピークが若干見られるものの、最後の塩基で

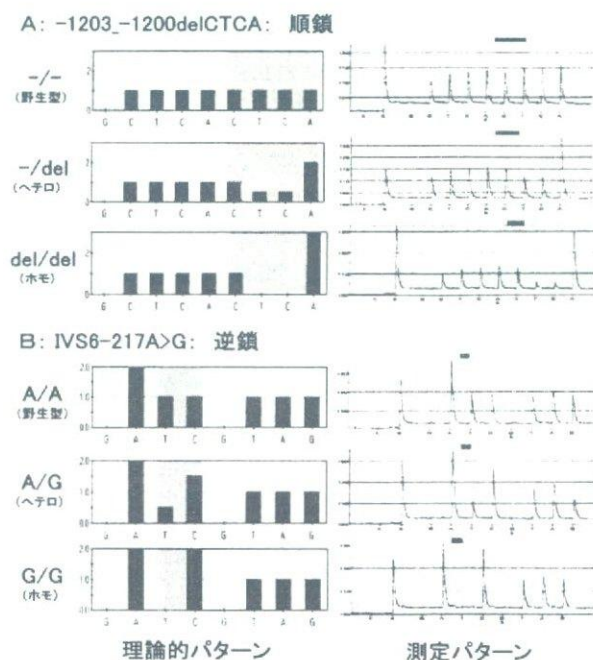


図2 パイロシーケンシング法による ABCG2 遺伝子多型のタイピング

ある A のピーク高さ及び当該 C 及び T ピークの低さから、判定が困難となることはなかった。また、本パイロシーケンシング法による解析結果は直接シーケンス法による結果と完全に一致した。従って、今回確立したパイロシーケンシング法によるタイピング系が有用であることが示された。

### 2) NAP (Nuclease Activated Probe)-ligation 法と DNA チップ検出を組み合わせたタイピング法の開発

CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 の 12 多型につき、83 検体を解析した。結果の一例として CYP2C19\*2 (681G>A) のタイピング結果のグラフを図 3 に示す。本多型では、G 特異プローブに Cy3、A 特異プローブに Cy5 を標識したので、Cy3 シグナルのみ高い方が G/G、Cy5 シグナルのみ高い方が A/A、

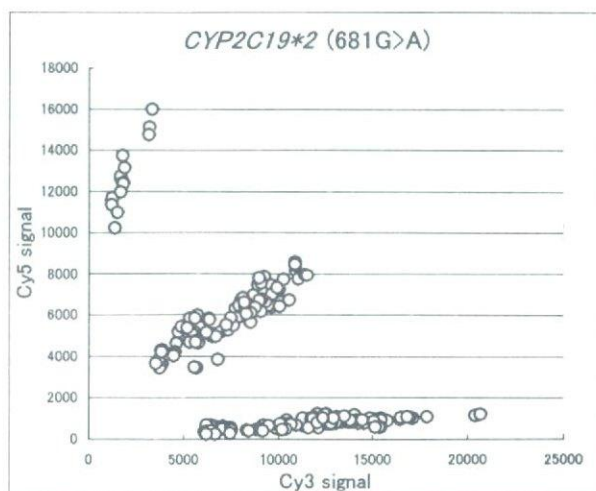


図3 NAP-ligation 法と DNA チップ検出を組み合わせた方法による CYP2C19\*2 のタイピング



両方のシグナルが認められたものがヘテロ (G/A) である。本法によるタイピング結果は、*CYP2D6* の一部の多型 (100C>T、-1584C>G) を除き、従来法によるタイピング結果と完全に一致した。

### ③バイオマーカー探索

#### 1) 再現性

##### a) 主成分分析結果に及ぼす分析条件の影響

第1回目(昨年度)の実験で採取した PCN 投与群 (n=6) とコントロール群 (n=6) のラット尿を用いて、HPLC の移動相流速とグラジエントの条件を変えて、分析条件の変更が主成分分析結果に及ぼす影響につき検討した。その結果、検出シグナルとしてポジティブ・イオン、ネガティブ・イオン、いずれを用いた場合でも、スコア・プロット上では、PCN 投与群とコントロール群は、ほぼ同様のパターンで分離した。従って、メタボノミクス・アプローチにおける主成分分析結果は、HPLC 条件の小さな変動には影響されず、再現性の高いデータが得られた。

##### b) 誘導実験時期の影響

PCN 投与群及びコントロール群につき、それぞれ1回目と2回目の実験で採取したラット尿を分析し、得られたクロマトグラムを用いて主成分分析を行ったところ、第2回目の実験の PCN 群とコントロール群は、それぞれ、第1回目の PCN 群とコントロール群と同一の領域に分布し、実験時期の相違は解析結果に影響を及ぼさず、再現性の高いデータが得られた。

#### 2) CYP3A1 mRNA の発現量とデキサメサゾン投与群、PCN 投与群、コントロール群の主成分分析

2回目の誘導実験により得られた肝臓を用いて、デキサメサゾン群、PCN 群及びコントロール群における、CYP3A1 mRNA の発現量を比較したところ、デキサメサゾン群と PCN 群ではコントロール群に比して、CYP3A1 mRNA 発現量が高く、薬物投与による発現誘導が確認できた。発現量は、デキサメサゾン群の方が、PCN 群に比べて、若干高い値を示した。

第1回目及び第2回目の誘導実験から得た3群のラットの尿成分について、検出シグナルとしてネガティブ・イオンを用いて分析したクロマトグラムに関する主成分分析の結果を、図4に示す。デキサメサゾン群は、PCN 群及びコントロール群の2群からは著しく離れた位置に分布し、一方、PCN 群とコントロール群とは明確に分離していたが、その距離は近かった。

これは、デキサメサゾンが PXR のリガンドで、CYP3A1、OATP、MDR などを誘導すると共に、グルココルチコイド受容体 (GR) のリガンドでもあり、ホルモン系及び免疫系に大きな影響を与えた結果、スコア・プロット上で特異な分布を示したと考えられた。

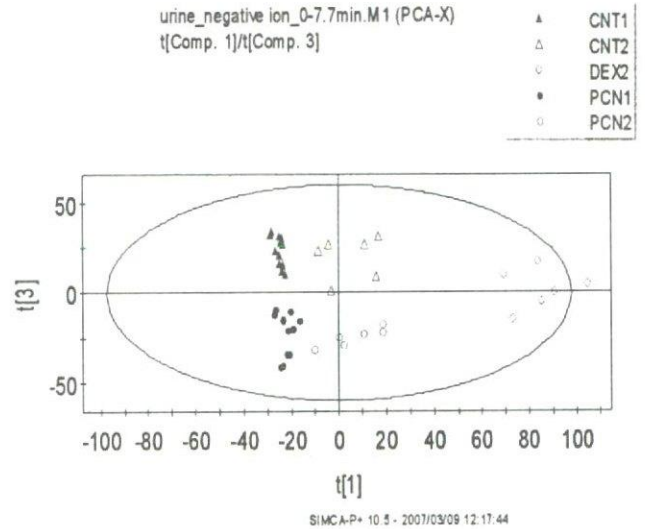


図4 PCN 群、デキサメサゾン群、コントロール群の尿成分における主成分分析のスコア・プロット  
検出イオン：ネガティブ・イオン  
赤：PCN 投与群、青：コントロール群、  
緑：デキサメサゾン群  
solid：1回目実験、open：2回目実験

#### 3) CYP3A1 発現レベルと相関するバイオマーカーの探索

誘導剤投与群とコントロール群との間で、各マーカーのピーク面積について t 検定を行い、CYP3A1 の mRNA レベルと相関するバイオマーカーを探索した。有意に差の見られたピークの中で、特に保持時間 1.55 分のあるピーク (ピーク A) は、PCN 群及びデキサメサゾン群での平均ピーク面積値が、コントロール群の値よりも大幅に高く ( $p < 0.000001$ )、検定の多重性を考慮してもその差は有意であった。

### D. 考察

#### ①遺伝子多型のインビトロ機能解析

##### 1) CYP3A4

インビトロ機能解析系に用いる組換え CYP3A4 酵素の調製には、酵母細胞系、昆虫細胞-バキュロウイルス系、哺乳動物細胞系、大腸菌系等が広



く用いられている。昨年度、酵母細胞に CYP3A4 野生型蛋白質を発現させてマイクロソームを調製したが、非常に低い活性しか示さなかった。ホロ酵素の発現は CO 差スペクトルにより確認されたことから、酵母のリン脂質膜中でヒト CYP3A4 と、共発現させた酵母 OR との間の再構築が困難であり、両者の間で電子伝達が効率よく行われていないことが示唆された。酵母発現系では、CYP1A1、1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C18、2C19、2D6、2E1 の発現が報告され、十分な活性が認められることから、酵母発現系では CYP3A4 特異的に OR との再構築が難しいと考えられた。

そこで昨年度より、昆虫細胞-バキュロウイルス系を用いた組換え酵素の発現を行った。宿主細胞の選択、MOI、感染時間の最適化により、高い CYP3A4 の発現が得られ、活性は精製 Cytochrome b5 の添加により 2 倍に増加した。このことから構築した昆虫細胞-バキュロウイルス系により発現した組換え CYP3A4 酵素は異型酵素の機能解析に有用と考えられる。

CYP3A4 で認められる多型のうち、CYP3A4\*16 (Thr185Ser) は日本人で比較的高いアレル頻度 (0.014) で見いだされ、テストステロン水酸化活性につき約 50% の低下を引き起こすことが報告されている。昆虫細胞-バキュロウイルス系で発現させた\*16 型酵素は、野生型と同等の発現量を有することが、CO 差スペクトル及びイムノブロットングにより確認された。

\*16 型酵素が有する Thr185Ser 置換の活性への影響では、Glo assay において、Luciferin BE の代謝活性が野生型の 15-20% に低下した。医薬品では、Cytochrome b5 存在下、代謝活性を検討したミダゾラムとカルバマゼピンで、\*16 型酵素は CYP3A4 野生型酵素に比して、いずれの化合物を基質とした場合も、 $K_m$  値は上昇し  $V_{max}/K_m$  値は低下したが、その程度は基質・反応により異なっていた。例えば、 $K_m$  値の上昇率は MDZ の 4-水酸化反応では約 45% であったのに対し、CBZ の 10, 11-エポキシ化反応 ( $K_{m2}$ ) では約 106% であり、 $V_{max}$  値の低下率は、MDZ の 4-水酸化反応では約 4% であったのに対し、CBZ の 10, 11-エポキシ化反応 ( $V_{max2}$  値) では約 47% であった。結果的に  $V_{max}/K_m$  値の低下率は、MDZ の 4-水酸化反応では約 31% であったのに対し、CBZ の 10, 11-エポキシ化反応 ( $V_{max2}/K_{m2}$  値) では約 74% と、大きな差が認められた。また、Cytochrome b5 非存在下行った 3 基質でも、同様の傾向が認められた。例えば、 $K_m$  値の上昇率は、MDZ の 1'-水酸化反応では約 277% であったのに対し、TSR の 6 $\beta$ -水酸化反応では約

47% であり、また  $V_{max}/K_m$  値の低下率は、MDZ の 1'-水酸化反応では約 78% であったのに対し、TSR の 6 $\beta$ -水酸化反応では約 51% であった。また  $V_{max}$  値の低下率も、MDZ の 1'-水酸化反応では約 18% であったのに対し、TFD の *t*-butyl 水酸化反応では約 51% であり、基質間で大きな差が認められた。従って、\*16 型酵素が有するアミノ酸置換 Thr185Ser の代謝活性への影響は、基質によって異なることが示唆された。

## 2) CYP2D6

本酵素は、肝臓、脳を始めとする比較的多くの組織で発現しており、抗精神病薬、循環器病薬、抗うつ薬、抗ヒスタミン薬等の非常に多くの医薬品の代謝に関与している重要な酵素である。遺伝子多型も現在までに 62 種が報告されており、日本人で比較的頻度の高いものとして、野生型 (\*1) の他に、野生型とほぼ同等の活性を有する \*2、全欠損型の \*5、部分的な活性低下を示す \*10、及びエクソン 9 部分が偽遺伝子である CYP2D7P と組換えられた \*36 が報告されている。

今回この \*10 及び \*36 につき、酵母細胞で発現した酵素を用いて解析を行った。ホロ酵素及びホロ+アポ酵素の発現量低下の度合いは、CYP2D6. 10 及び CYP2D6. 36 ではほぼ同等であり、発現量低下には共通に有する多型 Pro34Ser が関与していることが示唆された。本アミノ酸置換部位は N 末の、プロリンが豊富なモチーフ中に存在する。本モチーフは酵素蛋白質の他のポリペプチド部分との相互作用を通じて蛋白質の正常な折りたたみに関与することが示唆されており、アミノ酸置換により正常な立体構造の蛋白質が生成しえなかった可能性が考えられた。

次に、抗不整脈薬メキシレチン及び  $\beta$ -遮断薬ブフラロールを基質として酵素活性への影響を解析した。まず CYP2D6. 10 では、CYP2D6. 1 に比して、マイクロソーム蛋白当たりの  $V_{max}/K_m$  値が両基質で大幅に低下するものの、ホロ蛋白当たりでは有意な低下を示さなかったことから、単に蛋白発現量の低下によりマイクロソーム蛋白当たりの活性低下が見られたと考えられた。一方、ホロ酵素として正常な立体構造をとりえらると、多型が、今回用いた基質の代謝活性に及ぼす影響は少ないと考えられた。しかし、CYP2D6. 10 では、野生型に比して基質により 2-150 倍の  $V_{max}/K_m$  値変化が報告されており、活性変化に基質特異性があると考えられる。一方、CYP2D6. 36 では、メキシレチン代謝活性の低下が著しく、速度論的解析がで



きなかった。またブフラロールでは、大幅な  $K_m$  値の上昇と  $I_{max}/K_m$  値の低下が認められた。これは以前のブフラロール及びベンラファキシンの報告と同様であり、\*36は\*10に比べて、その活性低下は著しく、これにはC末付近のアミノ酸置換が関与していると考えられた。従って、さらなる\*36の基質特異性解析は必要なものの、今回の結果から考えると、\*36-\*10というタンデム構造を有するアリルの酵素活性に関して、\*36の寄与は小さいと思われた。

## ②タイピング系開発・評価

### 1) パイロシーケンシング法によるタイピング系の開発

疾患や薬物応答性との相関解析をする場合、個々の遺伝子多型を用いて解析するよりも、多型同士の連鎖に基づいたハプロタイプの方がより強い相関を得られることが近年多数報告されている。今年度は薬物トランスポーター *ABCG2*、薬物動態関連分子等の転写因子 *Nrf2* をコードする *NFE2L2*、及びその細胞内発現量を制御する *KEAP1* を対象に、比較的高頻度のハプロタイプを同定するためのタグ多型 14 種につき、パイロシーケンシング法によるタイピング系を確立した。使用ゲノム量も比較的少なく (12.5-20 ng)、また *NFE2L2* の-769G>A と -767G>A のように、近接した複数の多型も同時に解析可能である。今回開発した方法により、日本人における *ABCG2*、*NFE2L2*、*KEAP1* 遺伝子の頻度の高いハプロタイプを簡便で迅速にタイピングすることが可能となり、これらの分子に関するファーマコゲノミクス解析に有用と思われる。

### 2) NAP (Nuclease Activated Probe)-ligation 法と DNA チップ検出を組み合わせたタイピング法の開発

通常、1 遺伝子には 1 ヶ所以上の機能変化を伴う遺伝子多型があり、また複数の遺伝子産物が 1 つの薬物の代謝・動態に関与する場合が多い。従って、遺伝子多型による個人の酵素活性等の予測には、通常複数の遺伝子多型の情報を必要とするので、複数の遺伝子多型を一度に解析する方法が有用である。今回、本目的のため、NAP-ligation 法と DNA チップ検出を組み合わせたタイピング法を開発・検討した。本法は NAP-ligation の段階でタイピングをするため、DNA チップの段階では遺伝子の種類特定・検出を行うだけで良く、1 SNP あたり 1 本のプローブで検出が可能であ

る。また測定工数も少ないため、簡便・迅速である。今回の結果では、遺伝子構造が複雑である *CYP2D6* の一部の多型において、数検体で従来法と異なるタイピング結果が得られたものの、今後 NAP-ligation 用のプローブを変更することで、正確なタイピングは十分可能と考えられる。従って、本タイピング法は、一度に複数の多型を、多検体測定するのに有用と考えられる。

### ③バイオマーカー探索

PCN 及びデキサメサゾン投与の有無を、尿中の生体内代謝物を用いたメタボノミクス解析により識別することができた。PCN 及びデキサメサゾン投与により、ラットでは *CYP3A1* のみならず *OATP* や *UGT* など誘導されるので、残念ながら、今回のメタボノミクスの手法によって識別されたのは、*CYP3A* の活性差に起因する生体内代謝物の変化であると断定することはできない。しかし、研究結果で述べたピーク A は、PCN 群及びデキサメサゾン群の両投与群において高く検出され、かつコントロール群と有意な差が認められた。従って、当該ピークを与える分子が PCN 又はデキサメサゾンの代謝物であるとは考えにくく、また、*CYP3A1* mRNA 発現量とある程度の相関が見られることから、少なくともこれら 2 剤による誘導作用と関連するバイオマーカーであることが示唆された。今後、LC/MS/MS を用いて、この物質の同定を試み、*CYP3A1* との関連を明らかにする予定である。

## E. 結論

昆虫細胞バキュロウィルス系により、*CYP3A4* 酵素の大量発現系を確立した。本系を用いて、*CYP3A4*\*16 多型の機能解析を複数の基質につき行い、基質特異性を明らかにした。また、メキシレチン及びブフラロールにつき、*CYP2D6*\*10 及び\*36の影響を検討し、両多型の機能変化の違いを明らかにした。薬物トランスポーター *ABCG2*、転写因子 *NFE2L2* 及びその制御因子 *KEAP1* のハプロタイプタグ多型 14 種、及び *CYP2C9*、*CYP2C19*、*CYP2D6* で機能変化を伴う重要な計 12 多型、につきタイピング系を開発した。*CYP3A* を誘導する薬剤 2 種につき、その投与の有無をラット尿のメタボノミクス解析により識別し、薬剤群で共通に変化するピークを見いだした。

謝辞

本研究に特段のご協力を頂いた下記の方に深謝致します。

国立医薬品食品衛生研究所

機能生化学部・部長

澤田 純一

同・主任研究官

前川 京子

医薬安全科学部・室長

鹿庭 なほ子

岡山大学医歯薬学総合研究科助教授

埴岡 伸光

enzymes in vitro. 第20回国際生化学・分子生物学会大会（平成18年6月23日、京都）

2) 斎藤嘉朗、福島（上坂）浩実、前川京子、他：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）

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

N. Hanioka, Y. Okumura, Y. Saito, H. Hichiya, A. Soyama, K. Saito, K. Ueno, J. Sawada and S. Narimatsu: Catalytic roles of CYP2D6.10 and CYP2D6.36 enzymes in mexiletine metabolism: In vitro functional analysis of recombinant proteins expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1386-1395, 2006.

### 2. 学会発表

1) Y. Saito, N. Hanioka, K. Maekawa, et al.,: Identification of genetic polymorphisms of CYP1A2, a drug metabolizing enzyme, and functional abrogation of three variant

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

「薬物代謝酵素CYP1A2遺伝子の多型を検出するプライマーセット、プライマー及びプローブ、並びに該酵素の代謝活性の検査薬及びその検査方法」特願2005-187979（平成17年6月28日）

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



---

平成18年度  
政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団  
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル(小伝馬町駅前)4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社