

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晶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 讓 …… 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	綱脇祥子 …… 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 斎藤 嘉朗
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 薬物代謝で重要な4遺伝子の7多型につき、基質特異性を含め、多型による機能変化を詳細に明らかにした。16遺伝子の74多型につきタイピング系を7種の方法で開発・評価した。薬剤によるCYP3A1誘導と相関する化合物のピークをラット尿のメタボノミクス解析により見いだした。

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

し、タイピング系の開発・評価を行った。また環境要因による変動が大きい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、ラットを用いて、2種のCYP3A誘導剤投与による肝臓CYP3A1 mRNAレベルと相関するピークをメタボノミクス解析により探索した。

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る機能変化は、薬物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、機能変化が詳細に明らかにされたものは少ない。本研究では、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しうる薬物代謝酵素等の遺伝子多型を、インビトロ機能解析系を用いて明らかにする。また、これら多型の一斉タイピング系を開発する。さらに、遺伝子多型による活性予測が困難な遺伝子では、環境要因も反映するメタボノミクスの手法により、代謝活性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等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。

具体的には、インビトロ機能解析として、多くの薬物の代謝に関与する重要な代謝酵素CYP3A4、CYP2D6、CYP1A2、及び転写因子GRにつき解析した。これらの遺伝子を含め、薬物代謝・動態に関わる分子の中でも重要な16遺伝子の計74多型を選択

B. 研究方法

①遺伝子多型のインビトロ機能解析

1) CYP3A4

日本人で比較的高頻度に見られる*16(T185S)を対象とした。発現系として、まず哺乳動物細胞系(HepG2)及び酵母細胞(AH22)系を検討したが、それぞれ低収量及び低活性であったため、最終的に昆虫細胞(Sf21)系により、野生型及び*16型酵素を大量発現し、マイクロソーム画分を調製した。発現したホロ酵素蛋白質量は還元型CO差スペクトルにより、ホロ+アポ蛋白質発現量はイムノブロッティングにより測定した。NADPH-P450還元酵素(OR)活性は、チトクロムCの還元活性より算出した。酵素活性は、Luciferin BE、ミダゾラム(MDZ)、カルバマゼピン(CBZ)、テストステロン、テルフェナジンを基質として測定した。

2) CYP2D6

日本人で高頻度に存在し、かつ機能低下が報告されている*10及び*36を対象とした。両者は、ほとんどが*36-*10とタンデムに並んだ構造として存在することが報告されており、基質によるそれぞれの活性低下度を明らかにすることは重要である。酵素蛋白質は、酵母ORとの共発現系を用いて、酵母細胞(AH22)系にて発現し、マイクロソーム画分を調製した。発現量等はCYP3A4の場合と同様に測定した。酵素活性は、メキシレチン(MXL)

及びブフラロール(BFL)を基質として測定した。

3) CYP1A2

日本人で新たに見いだされた*15 (P42R)、*16 (R377Q)、及び*8 (R456H)を対象とした。発現は、活性測定用にハムスター繊維芽細胞株V79を用い、還元型CO差スペクトル測定用に昆虫細胞(Sf21)系を用いた。これらの系で野生型及び異型酵素を発現し、マイクロソーム画分を調製した。発現量等はCYP3A4の場合と同様に測定した。酵素活性は、7-エトキシレゾルフィン(7-ETR)及びフェナセチン(PNC)を基質として測定した。

4) Glucocorticoid receptor (GR)

日本人で新たに見いだされたK140Nを対象とした。野生型及び異型受容体をCOS-7細胞で発現し、ルシフェラーゼレポーターベクターを用いて、リガンドであるデキサメサゾン(DEX)により誘導される発光強度により転写活性を測定した。また、mRNA発現レベルをTaqMan法で、蛋白質発現レベルをイムノプロット法で測定した。

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

対象は、薬物代謝酵素CYP3A4の4多型[T185S(*16)、L293P(*18)、T363M(*11)、IVS10+12G>A(*16)]、UGT1Asの20多型[UGT1A3Q6R、W11R、R45W、V47A、UGT1A6S7A、R90H、S103X、T181A、R184S、UGT1A7N129K、R131K、W208R、UGT1A8A173G、UGT1A9S141C、Y242X、D256N、UGT1A10A2T、M59I、E67G、T2021]、薬物トランスポーターABCG2の9多型[-1203_-1200delCTCA(Block-1)、V12M、Q126X、Q141K、IVS6-217A>G(以上、Block1)、IVS9-60A>T、IVS11+20A>G、S441N、IVS14-46A>G(以上Block2)]、転写因子NFE2L2の5多型[-1123A>G、-769G>A、-767G>A、-733C>A、2229T>G]、及びその制御因子KEAP1の4多型[-3088C>G、L471L、Y537Y、2324G>A]、の計42多型である。これらにつき、ビオチン化プライマーを用いたPCR反応後、片側鎖をストレプトアビジンビーズで精製し、ミニシーケンシングにより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開発

対象多型は、薬物代謝酵素CYP2C9*3、CYP2C19*2、*3、CYP2D6 2850C>T、*4、*5、100C>T、*14、*18、*21、-1584C>G、重複の12種類とした。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、5'末端の塩基が多型部位

でミスマッチとなる共通プローブをハイブリさせた。次にDNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性により、特異プローブの3'末の配列特異的に共通プローブの5'末端の塩基を切断し、さらに共通プローブと特異プローブを結合させる。このNAP-ligation反応により多型特異的に連結されたプローブを、遺伝子特異的なプローブを結合させたDNAチップで検出した。本法により、一度に上記12種類の多型タイピングを行うことが可能である。

3) インベーター法によるタイピング系の検討

薬物代謝酵素UGT1A1*1B及び*60を対象とし、アッセイ用プローブ類は購入した。反応液はサンプルとプローブ・酵素混液を同量混ぜ、その上にミネラルオイルを重層した。反応温度条件は*1Bと*60ともに63°C、反応時間は*1Bが4時間、*60は最適時間条件を決めるため10、20、40分で行った。反応後、各アレルにつき蛍光光度計で測定し、タイピングを行った。

4) SELMAP(Self Selective Multi Amplification Primers)-PCR法の検討

CYP2C9*3、CYP2C19*2、*3を対象に、アレル特異的なPCR法の改良型であるSELMAP-PCR法によるタイピング系の正確性をシーケンシング結果と比較することにより検討した。多型部位に特異的な配列を有するアレル特異的なプライマーを順鎖と逆鎖に設定し、各々の特異的なプライマーに対となるプライマーを組み合わせて用い、1本のチューブでPCRによる増幅を行った後、各特異的なプライマーにより増幅された産物の長さを、アガロース電気泳動で測定し、アレルタイプを判定した。

5) SNaPshot法によるタイピング系の開発

薬物トランスポーターABCB1のハプロタイプ同等等に重要な多型12種[E109K、G412G、A893S/T、I1145I、I1196S、V1251I、-129T>C、-1789G>A、IVS26+59T>G、IVS21+49T>C、IVS13+81C>T、IVS27-182G>T]をタイピング対象に選択した。まず多型を6種ずつ2グループに分類し、各グループにつきMultiplexでPCR増幅した。精製した増幅産物を鋳型とし、それぞれ6種の長さが異なるタイピングプライマーを用いて一塩基伸長反応を行った。蛍光ラベルされた各伸長反応産物は、キャピラリー電気泳動により分離し解析した。

6) その他

アレル特異的なプライマー(ASP)-PCR法によるタイピング系の評価を、CYP3A4*16、*18、*11、*16の4種類につき行った。また、薬物代謝酵素DPYDで検出されたアミノ酸置換を伴う一塩基多型のうち、比較的出現頻度が高い6多型を検出する Simultaneous Multiple Mutation Detection

(SMMD)法チップの評価を行った。

③バイオマーカー探索

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 α -carbonitrile)及びデキサメサゾン (DEX)を3日間腹腔内投与し、3日目の投与直後から絶食下で24時間採尿した。尿は遠心後、水で5倍に希釈し、HPLC-TOFMS法による分析に供した。測定は、各検体2回ずつ行った。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、単位保持時間当たり強度の強いもの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、主成分分析を行った。一方、最終投与24時間後の肝臓におけるCYP3A1のmRNA発現量をリアルタイムRT-PCR法で測定した。なお、誘導実験は、まず第1回目として、PCN投与群及び対照群各6匹ずつで行い、第2回目として、PCN投与群、DEX投与群、対照群各3匹ずつで行った。

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」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「動物の愛護及び管理に関する法律」等を遵守し、最小匹数を用い、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

検討の結果、Sf21細胞にMOI=4.0でウイルスを感染させ、72時間後に細胞を回収する条件に決定し、CYP3A4及びORを共発現する昆虫細胞マイクロソームを3ロット調製し、5基質につき活性測定を行った。Luciferin BEを基質とした解析では、*16の酵素活性は、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

酸化反応では野生型と*16型で差はなかったが、CBZの10,11-エポキシ化反応では約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-エポキシ化反応では約74%と、大きな差が認められた。Cytochrome b5非存在下行った3基質でも、同様の基質による差が認められた。

2) CYP2D6

CYP2D6の野生型、*10型及び*36型酵素のホロ+アポ蛋白質発現量は、野生型を100%とすると、両異型では約30%に低下した。一方、ホロ蛋白質発現量は、両異型で約5%に低下した。従って、両異型蛋白質では、酵素活性を有するヘム蛋白質レベルが大幅に低下していると示唆された。MXLを基質とした場合、*36型酵素の活性は非常に低く、速度論的解析は不能であった。*10型酵素では、野生型に比して、マイクロソーム蛋白質当たりの V_{max} 値は約6.5%であり、 V_{max}/K_m 値は5%以下となった。一方、ホロ蛋白質当たりの V_{max} 値及び V_{max}/K_m 値は、野生型と有意な差はなかった。BFLの1'-水酸化反応の場合、 K_m 値では、野生型に比して、*10型で約2.8倍、*36型で約14倍の有意な上昇が見られた。マイクロソーム蛋白質当たりの V_{max} 値では、野生型に比して*10型で約13%、*36型で約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。ホロ蛋白質当たりでの V_{max} 値及び V_{max}/K_m 値は、*10型の場合、野生型との間で有意な差はなかったが、*36型の場合は V_{max} 値が約62%に、 V_{max}/K_m 値が約5%に、それぞれ低下した。

3) CYP1A2

mRNA発現レベルは、野生型及び3異形酵素間で有意な差はなかったものの、蛋白発現レベルでは、*15型酵素で約34%の、*16型と*8型で約70%の有意な低下が認められた。次に7-ETRを基質として代謝活性を測定したところ、野生型に比して、*16型で K_m 値の約9倍の上昇が、また全ての異形酵素で V_{max}/K_m 値の1%以下への低下が見られた。また、PNCを基質とした場合も、全ての異形酵素で5%以下に活性が低下した。この活性低下は、ヘム蛋白質レベルの低下に基づくことを、還元型CO差スペクトルで確認した。

4) Glucocorticoid receptor (GR)

mRNA発現レベルは野生型及びK140N型間で有意な差はなかったものの、蛋白発現レベルでは、K140N型で約86%の大幅な低下が認められた。転写活性では、K140N型で約33%の低下が観察された。K140N置換は細胞内局在に影響しなかった。

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

開発した系により 42 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 DNA につき明瞭なタイピング結果が得られた。また、本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。

2) NAP-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、本法によるタイピング結果が、*CYP2D6* の一部の多型を除き、従来法によるタイピング結果と完全に一致することを確認した。

3) インバーダー法によるタイピング系の検討

*UGT1A1*1B* の場合、既定条件にて明瞭な結果が得られた。**60* では、500 倍希釈のサンプルを用い、反応時間 10 分で得られた結果が最適だった。これらの結果はシーケンシングでの結果と一致した。

4) SELMAP-PCR 法の検討

確立した方法で、*CYP2C9*3*, *CYP2C19*2* 及び **3* につき、各々 85, 68, 62 種の細胞株ゲノム DNA をタイピングした結果、全ての細胞株及び多型で理論値通りの長さの増幅バンドが得られ、その結果はシーケンシングによる結果と完全に一致した。

5) SNaPshot 法によるタイピング系の開発

開発した方法により多型解析を行ったところ、解析結果はシーケンシングによる結果と完全に一致した。即ち、多型部位における 2 種のアレルが、いずれかのホモ接合体の場合は各塩基に対応した一本のピークが、ヘテロ接合体の場合は、2 種類の塩基を示す 2 本のピークが検出された。

6) その他

開発した ASP-PCR 及び SMD による方法は、検討した多型・検体につき、正確にタイピングできることを確認した。

③ バイオマーカー探索

誘導実験により得られた肝臓を用いて、DEX 群、PCN 群及び対照群における、*CYP3A1* mRNA の発現量を比較したところ、DEX 群と PCN 群では対照群に比して、*CYP3A1* mRNA 発現量が 20-30 倍高く、発現誘導が確認された。発現量は、DEX 群の方が PCN 群に比べて、若干高かった。2 回の誘導実験から得た 3 群のラットの尿成分について主成分分析した結果、これら 3 群を明確に分離できた。DEX は PXR のリガンドであるが、同時に GR のリガンドでもあり、内分泌系及び免疫系に影響を与えた結果、PCN 群とも分離したと考えられた。さらに薬剤投与 2 群と対照群と

の間で、*CYP3A1* の mRNA レベルと相関するバイオマーカーを探索し、保持時間 1.55 分のあるピーク (ピーク A) では、PCN 群及び DEX 群での平均ピーク面積値が対照群の値よりも有意に高い ($p < 0.000001$) ことを見いだした。

D. 考察

① 遺伝子多型のインビトロ機能解析

1) *CYP3A4*

CYP3A4 は処方薬の約半数の代謝に関与する最も重要な酵素である。日本人で比較的高いアレル頻度 (0.014) で見いだされた多型、*CYP3A4*16* (T185S) を検討した。**16* 型酵素を HepG2 細胞で発現した場合、蛋白発現量は約 63% に低下するが、酵母細胞や昆虫細胞ではこのような低下は見られない。従って、蛋白の安定性は発現系により異なることが示唆され、多型による発現レベルの変化は哺乳動物細胞系で確認すべきと考えられた。しかし哺乳動物細胞系では発現蛋白の収量が少ないため、基質特異性解析や CO 差スペクトル測定など、大量に必要な場合には、昆虫細胞系や酵母細胞系を用いることが現実的である。

**16* 型酵素では、5 基質につき代謝活性を解析し、速度論的パラメーター (K_m 値及び V_{max} 値) への多型の影響が基質により異なることを明らかとした。T185 は *CYP3A4* の立体構造上、E-ヘリックス上にあり、ヒト *CYP3A* 間で保存されている。しかし基質結合部位からは離れた位置にあり、基質差発現の機構は不明であるが、T185S 置換による立体構造変化により、基質の進入ポケットや基質認識部位の立体構造変化が二次的に引き起こされた可能性が考えられる。いずれにしても、本多型の影響は基質毎に検討すべきであると考えられた。

2) *CYP2D6*

本酵素は、循環器病薬、抗うつ薬、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 62 種報告されているが、日本人で頻度の高い **10* 及び **36* を対象とした。抗不整脈薬 MXL 及び β -遮断薬 BFL を基質として酵素活性への影響を解析した。**10* 型酵素では、野生型に比して、ミクロソーム蛋白当たりの V_{max}/K_m 値が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ミクロソーム蛋白当たりの活性低下が見られたものの、ホロ酵素として正常な立体構造をとりえると、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、**10* 型では、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、*36 型酵素では、MXL 代謝活性の低下は著しく、また BFL でも、大幅な K_m 値の上昇と V_{max}/K_m 値の低下が、ホロ蛋白当たりでも認められた。これは以前のベンラファキシンでの報告と同様であり、*36 型酵素は*10 型に比べて、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 型酵素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の酵素活性に関して、*36 の寄与は小さく、*10 の代謝活性を基質毎に検討すべきであると考えられた。

3) CYP1A2

CYP1A2 は気管支拡張剤テオフィリン等の代謝に関与する。解析した 3 種の多型はいずれもヘム酵素蛋白質レベルを大幅に低下させ、酵素活性の大幅な低下をもたらすことが明らかとなった。従って、これら 3 種の多型を有するヒトに本酵素で代謝される医薬品を投与する際は、慎重に行うべきであると考えられた。

4) Glucocorticoid 受容体 (GR)

GR は抗炎症作用を有するステロイド剤の標的分子であると共に、CYP2C8 や CYP3A4 等の発現を制御する転写因子である。解析の結果、K140N 型では、蛋白発現量が約 86%低下したが、転写活性は約 33%しか低下しなかった。このことから、受容体当たりの転写活性は上昇するものの、蛋白発現量を考慮すると活性は低下すると考えられた。

②タイピング系開発・評価

パイロシーケンシング法、インベーター法、NAP-ligation-DNA チップ法、等の 7 種の方法につきタイピング系を開発・評価した。いずれの方法も、有用な方法と考えられたが、各方法の特徴としては、以下の点が挙げられる。

1) NAP-ligation-DNA チップ法、SNaPshot 法、SMD 法は、複数の多型を同時に解析できる。

2) パイロシーケンシング法はミニシークエンス法なので多型前後の配列に比較的左右されない。

3) ASP-PCR 法、SELMAP-PCR 法及びインベーター法は、比較的安価で繁用される機器のみで解析が可能。また ASP-PCR 法及び SELMAP-PCR 法は標識等が必要なく、インベーター法は各多型に共通の標識プローブを用いることができる。

各手法には一長一短があり、目的多型の種類・数・特徴、等に応じて使い分ける必要があると考えられた。簡便な ASP-PCR 法、SELMAP-PCR 法及びインベーター法は、比較的少数多型部位のタイピ

ングに、NAP-ligation-DNA チップ法等は、多数の多型部位を同時に解析する目的に、特に有用と思われる。

③バイオマーカー探索

PCN 及び DEX 投与の有無を、尿中の生体内代謝物のメタボミクス解析により識別することができた。また、研究結果で述べたピーク A は、PCN 群及び DEX 群の両投与群において高く検出され、かつ対照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 DEX 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

薬物代謝で特に重要な 4 遺伝子の 7 多型につき、基質特異性を含め、多型による機能変化を詳細に明らかにした。これらを含め、薬物代謝・動態等に関与する 16 遺伝子の、ハプロタイプタグ多型や機能変化が報告された多型 74 種につき、タイピング系を 7 種の方法で開発・評価した。CYP3A1 を誘導する薬剤群投与の有無をラット尿のメタボミクス解析により識別し、CYP3A1 発現レベルと相関する化合物のピークを発見した。

本研究の成果は、日本人における薬物代謝酵素等の活性予測法確立に資するものであり、患者個別化薬物治療のための重要な情報である。また、薬理遺伝学的情報等の医薬品開発・申請への利用に当たって基盤の情報となるものである。

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

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Saito, N. Hanioka, K. Maekawa, et al.: Functional analysis of three CYP1A2 variants found in a Japanese population. *Drug Metab.*

Dispos., 33, 1905-1910 (2005).

- 2) S. Koyano, Y. Saito, S. Ozawa, et al.: Functional characterization of a K140N human glucocorticoid receptor variant. *Int. J. Pharmacol.*, 1, 316-323 (2005).
- 3) A. Soyama, Y. Saito, T. Kubo, et al.: Sequence-based analysis of the CYP2D6*36-CYP2D6*10 tandem-type arrangement, a major CYP2D6*10 haplotype in the Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 21, 208-216 (2006).
- 4) M. Saeki, Y. Saito, H. Jinno, K. Sai, et al.: Haplotype structures of the *UGT1A* gene complex in a Japanese population. *Pharmacogenomics J.*, 6, 63-75 (2006).
- 5) N. Hanioka, Y. Okumura, Y. Saito, et al.: 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, H. Fukushima-Uesaka, et al.: SNPs in *CYP3A4* and *CYP3A5* are in strong linkage disequilibrium in Japanese population. 第8回国際臨床薬理会議 (平成16年8月4日、オーストラリア・ブリスベーン)
- 2) M. Itoda, Y. Saito, K. Sai, S. Ozawa, K. et al.: Analysis of single nucleotide polymorphisms in the *ABCB1*, *ABCC2* and *ABCG2* gene in irinotecan-administered Japanese subjects. 第19回日本薬物動態学会年会 (平成16年11月17日、金沢)
- 3) S. Ozawa, M. Saeki, Y. Saito, et al.: Genetic polymorphisms of the *DPYD* gene encoding

dihydropyrimidine dehydrogenase in a Japanese Population. 第19回日本薬物動態学会年会 (平成16年11月19日、金沢)

- 4) 斎藤嘉朗、祖山晃子、前川京子、小澤正吾、他: 日本人における薬物代謝酵素CYP1A2の遺伝子多型探索とハプロタイプ解析。日本人類遺伝学会第50回大会 (平成17年9月21日、倉敷)
- 5) 斎藤嘉朗、埴岡伸光、前川京子、磯部隆史、他: 日本人で見いだされた薬物代謝酵素CYP1A2遺伝子多型の機能解析。第78回日本生化学会大会 (平成17年10月20日、神戸)
- 6) Y. Saito, N. Hanioka, K. Maekawa, et al.: Identification of genetic polymorphisms of CYP1A2, a drug metabolizing enzyme, and functional abrogation of three variant 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)
- 7) 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)

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