

genes may be associated with susceptibility to the antihypertensive effects of calcium channel blockers 61th Annual High Blood Pressure Research Conference 2007

平成 19 年 9 月 27 日 ツーソン, アメリカ合衆国

3) Kamide K, et al. Pharmacogenomic approaches targeted on the tailor-made medicine for hypertension. 第 72 回日本循環器病学会総会・学術総会 平成 20 年 3 月 28 日—30 日 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

遺伝子多型検索による高血圧個別化診療の確立に関する研究

「ゲノム時代の臨床研究とイノベーション支援体制」
-分子診断技術の進歩と体外診断用医薬品（IVD）の国際統合化（第2報）-

分担研究者 佐瀬 一洋 順天堂大学臨床薬理学 教授

研究要旨:ゲノム情報をもとにした予防・診断・治療のパラダイム・シフトが期待されている。遺伝子型やハプロタイプを迅速かつ安価に決定することが可能になるなかで、質の高い臨床研究を計画・実施するための支援体制は未整備であり、基礎研究の成果を臨床に応用するいわゆる橋渡し研究に期待が高まっている。イノベーションの種を結実させるためには、薬事承認および保険適用を目指した開発が必要となるが、今年度も昨年度より引き続き、近年国際統合化が進みつつある医療機器の規制に焦点を当てて、分子診断技術を体外診断用医薬品（IVD）として提供するために必要な支援体制や、克服すべき隘路について検討した。

A. 研究目的

分子診断技術を体外診断用医薬品として開発する際に考慮すべき規制要件について検討し、臨床研究支援体制を確立する。

B. 研究方法

わが国における体外診断用医薬品の規制要件を検討する。次に、米国や欧州など海外における国際統合化の動きを調査する。その上で、高血圧個別化医療の実現に向けて必要となる臨床研究支援体制を確立する。

（倫理面への配慮）

GEANE 研究は、ヘルシンキ宣言および臨床研究の倫理指針に従い、各実施医療機関の倫理審査委員会において研究実施計画書および説明同意文書の審議・承認を得た多施設共同試験である。

C. 研究結果

GEANE 研究は、高血圧の個別化医療に向けて、基礎研究の成果を臨床に応用するための橋渡し

研究である。初年度である平成 17 年度には、臨床研究実施計画書（プロトコル）を作成し、臨床試験登録制度への対応、研究事務局の整備、臨床試験登録への対応等を行った。平成 18 年度は主に症例登録を推進し、ランダムイゼーションの均等性などを監視した。その結果、154 例の登録があり、患者登録の難しいとされるクロスオーバー試験としては多くの症例をエントリーし得た。さらに本年度、昨年度から引き続き分担研究者は、体外診断用医薬品（IVD: In vitro diagnostics）に関する国内外の規制要件を調査検討し、分子診断技術の臨床的意義を検討するために必要な臨床評価体制について考察した。

(1) 体外診断用医薬品（IVD）とは

体外診断用医薬品（IVD: in vitro diagnostics）とは、疾病の診断補助や経過観察に用いられるものである。多種多様なものが存在するが、臨床上有用な新規測定系の開発、感度・特異度・利便性等を向上させた測定系の改良が行われている。新規項目については医薬品や医療機器における「治

験」に相当するものとして「臨床性能試験」が行われることとなっており、改良品については「既承認体外診断用医薬品との相関性データ」が必要とされている。

体外診断薬の臨床性能試験で大事なことは、標的疾患または異常に関して個人の診断に役立つデータを集め解析することである。統計的解析で有意になることのみでは基本的に何の意味も持たず、確実に現時点での診断にさらに有益なデータを追加することを証明しなければならない。

データの解析により、診断の補助とできる「参考正常範囲」（基準範囲）と疾病の有無の判断のための「カットオフ値」が求められ、それにより、妥当な「有病正診率」および許容できる「無病正診率」を示す必要がある。

依頼者または国内管理人は医療機関に文書で依頼して契約を行うが、いわゆる新 GCP に相当する規定は存在しない。被験者に対しては説明し同意を得るように要請することとされているが、IVD の特殊性を考慮した GCP を早急に整備することが望まれてきた。

(2) IVD 規制の国際統合化について

体外診断用医薬品は、わが国では薬事法上「医薬品」に分類されてきた。平成 17 年に改正薬事法が施行され、諸外国における IVD 規制との国際整合性を考慮して、「医療機器」に分類されることとなった。

低リスク IVD： 診断情報リスク（確定診断に与える寄与が比較的低いと考えられる測定項目）の中で、較正用標準物質があり自己点検が必要なもの（GOT、GPT、グルコース等約 100 項目）については、体外診基本要件（Essential Principles）を満たせば承認不要（自己認証）となったが、品質システム型の GMP が適用される。

それ以外の低リスク IVD（Hb、Ht、細菌学的検査、自己免疫測定、細胞性免疫検査等、320 項目）については、体外診基本要件に加え、相関性基準として既存品との相互比較試験を実施すること

が求められるが、厚生労働大臣承認ではなく、第三者機関による認証が可能となった。

その他の IVD： 診断情報リスクが比較的大きく、情報の生命維持に与える影響が大きいと考えられるものおよび新測定項目（がん、感染症診断（HIV、HCV 等）、遺伝子診断薬（NAT 等）、その他）については、米国では FDA による承認が必要であり、EU でも第三者認証を求めているため、わが国においても体外診基本要件や品質システム型 GMP を満たしているかどうかについて医薬品医療機器総合機構（PMDA）における審査を行ったのち、厚生労働大臣による承認というプロセスが必要である。とくに GEANE 研究の成果によって遺伝子診断が高血圧の臨床の現場に導入される可能性があり、今後糖尿病や高血圧といった生活習慣病の領域において IVD が急速に増加して行く可能性があるため承認プロセスなどの整備が必要である。

(3) 分子診断技術のイノベーション支援体制

有病群と無病群： 有病群は質の高い臨床研究により確定診断されており、その診断根拠のデータが整備されていなければならない。また、無病群は健常者あるいは該当疾患に関して罹患していない群であり、その内容は吟味され、的確に定義されていなければならない。

特別に検討すべき群： 該当疾患と鑑別すべき疾患群、測定あるいは検出項目と相同性の高いタンパクや物質（医薬品等も含む）が存在する群、肝機能異常群、腎機能異常群、免疫疾患群（免疫反応を利用した測定系の場合は必須）等の実際の臨床検体で該当疾患を判定する際に問題になる対象で解析することが必要である。これらは偽陽性、偽陰性を示す可能性があり、それが確実である場合、臨床現場に情報を提供する必要があるからである。

D. 結論

体外診断用医薬品（IVD）の開発において、検

討すべき検体が多いことは、イノベーションの実現に対する大きな障害となっている。広範囲に症例を集めることは難しく、これらの解析が不十分なまま、臨床現場で利用される場合、特異症例での干渉・妨害や、妨害薬剤・妨害物質に関する情報など、利用者側からの有効性、安全性などの性能に関する情報を集積、整理、一元的な管理の元での情報の迅速なフィードバックを行う機構の整備と支援が必要である。

また、別の問題として、目的疾病の検体収集に際しても、疾病初期、経過時等、個々の患者の様々な時期の検体が必要であるが、特に稀少疾病の場合、検体を解析に十分な数揃えることが難しい。したがって、長期にわたり採取、保存されている検体や全国から集めた検体を使用しなければいけない場合も多く、医薬品の治験とは異なった難しさがある。この点では高血圧や糖尿病といった疾患患者数の多い生活習慣病に関連する IVD を用いた診断法の確立は稀少疾患のそれと比べて容易であるため、その承認過程を急ぐ必要があると考えられる。

また、医薬品や治療用医療機器と比較すると、規制の国際統合化が未整備である。GHTF (Global Harmonization Task Force) の第5分科会において医療機器の臨床評価に関する用語の定義や方法論の例示が行われたが、今後 IVD の臨床評価についても新たに専門家を招いて検討して行く必要があると考えられる。

E. 結論

ゲノム時代を迎え、遺伝子情報やプロテオミクスを応用した分子診断技術が急速に発展しつつある。しかしながら、新たなバイオマーカーが良いサロゲートであることを証明するためには質の高い臨床データが必要である。分担研究者らは、高血圧の至適治療に関する先進的な大規模臨床研究である GEANE 研究の実施を通じて、臨床評価の国際統合化や研究支援体制の整備など新たな

厚生労働行政上の課題を見出し、イノベーション推進に向けて具体的提言をまとめるべく研究を続けている。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tatsumi E, Nakatani T, Imachi K, Umezumi M, Kyo SE, Sase K, Takatani S, Matsuda H. Domestic and foreign trends in the prevalence of heart failure and the necessity of next-generation artificial hearts: a survey by the Working Group on Establishment of Assessment Guidelines for Next-Generation Artificial Heart Systems. *J Artif Organs* 2007; 10:187-194.
- 2) Iwami T, Kawamura T, Hiraide A, Berg RA, Hayashi Y, Nishiuchi T, Kajino K, Yonemoto N, Yukioka H, Sugimoto H, Kakuchi H, Sase K, Yokoyama H, Nonogi H. Effectiveness of bystander-initiated cardiac-only resuscitation for patients with out-of-hospital cardiac arrest. *Circulation* 2007; 116:2894-2896.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許取得・実用新案登録 なし

厚生科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業） 分担研究報告書

遺伝子多型検索による高血圧個別化医療の確立に関する研究 -候補遺伝子アプローチによる降圧剤感受性遺伝子同定の戦略-

分担研究者 宮田 敏行 国立循環器病センター研究所 病因部 部長
研究協力者 松本 幸子 国立循環器病センター内科腎高血圧部門 特任研究員

研究要旨：降圧剤感受性遺伝子を同定する戦略として、降圧剤の代謝や動態、高血圧の成因に関わるようなタンパク質が候補として考えられる。薬物代謝に関わる遺伝子は、チトクローム P450 (CYP) などの薬剤代謝酵素やトランスポーターなどがあり、これらの遺伝子多型はこれまでの研究で集積されてきた。ここでは、薬剤代謝関連遺伝子にミスセンス変異を起こす多型で、日本人でマイナーアレル頻度が5%以上を示すもの、さらには、降圧薬の効果に関わると報告されている遺伝子多型を候補遺伝子多型として選別し、タイピングを行った。

A. 研究目的

薬物治療の個別化や副作用を未然に回避するため、ファーマコゲノミクス、特に、ゲノム多型情報を個別化医療の1つの柱として活用することが期待されている。作用標的の異なる幾種類かの降圧剤が広く用いられているものの、どの薬剤がどういった患者の第一選択薬になるかなどの個別化医療に関しては経験によるところが大きく、エビデンスの蓄積と収集が求められている。薬剤の吸収や代謝には多種のタンパク質が関与しているので、これらの機能に影響を与える可能性のあるミスセンス変異は、個別化医療を目指す研究の解析対象となる。ここでは、高血圧個別化医療の確立を目的として進めている無作為交叉前向き多施設臨床研究（GEANE 研究）の解析対象である候補遺伝子多型について報告する。

B. 研究方法

GEANE 研究で集積された DNA 146 検体を対象とし、Taqman Probe 法にて遺伝子多型をタイピングした。候補遺伝子多型の選別については、1) 薬物代謝酵素/薬物輸送に関わる遺伝子の多型、および、2) 既報の論文等より降圧剤効果に関わる遺伝子多型を選択した。前者は、チトクローム P450 (CYP)、トランスポーター、酸化還元酵素、転移酵素、脱水素酵素遺伝子など、ABI 社の Drug Metabolism Assays のアレル頻度情報をもとに、機能への影響が懸念されるミスセンス変異で、かつ、日本人のアレル頻度が5%以上のものをタイピングの候補多型とした。また、後者は、GEANE 研究に用いたアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB)、カルシウム拮抗薬 (CCB)、サイアザイド系利尿薬 (TZD) の三剤のみならず、 β 遮断薬や ACE 阻害薬まで範囲を広げ、遺伝子多型情報を

収集した。

(倫理面での配慮) GEANE 研究は、国立循環器病センターおよび分担研究者が所属する施設の倫理委員会で審議され承認を受けた。GEANE 研究参加者は、研究目的などを説明した上で、書面にて同意を頂いた。

C. 研究結果

Drug Metabolism Assays は、220 種類以上の薬物代謝関連酵素遺伝子及び薬物輸送タンパク質遺伝子上に存在する多型 (2000 種類以上) をタイピングできる。このうち、CYP でマイナーアレル頻度が 5% 以上のミスセンス変異を伴う多型は 25 種類であり

(表 1)、CYP 以外の遺伝子多型は 83 種類であった (表 2)。また、既報論文等より選択した降圧剤効果に関わる遺伝子多型は、国立循環器病センター研究所から報告した 10 種類を含む、37 種類であり (表 3)、降圧剤の標的因子 (受容体/それ以降のシグナル伝達系) や α アデューシン (ADD1) など、薬物動態や高血圧の成因に関わる遺伝子が含まれていた。これらの多型をタイピングしたところ、ABCB5 の Met1Thr 変異と AGT の Lys137Asn 変異は遺伝子型のメジャーホモとヘテロのシグナル分離が不十分であり、タイピングできなかった。SLC28A1 の Arg510Cys の変異を除く全ての多型で、ハーディー・ワインバーグ平衡 (HWE) が成立していた。

D. 考察

降圧剤感受性遺伝子を同定する戦略として、降圧剤の代謝や動態、高血圧の成因に関わるようなタンパク質が候補として考えられる。今回の検討では、二方向から選別

した 145 種類の多型のうち一部を除いて Taqman Probe 法により解析可能であることが判明した。

GEANE 研究で収集された試料の臨床情報が整っておらず、タイピングを行った遺伝子多型と降圧剤効果との間の関連性について検討するまでに至っていないが、本研究のような網羅的解析により、将来、降圧剤感受性判定多型チップの開発など高血圧の個別化医療に展開できるような結果が導きだされると期待している。

E. 結論

降圧剤感受性遺伝子同定のため、候補遺伝子多型の選別とタイピングを行い、統計解析の準備を整えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Banno M, Hanada H, Kamide K, Kokubo Y, Kada A, Yang J, Tanaka C, Takiuchi S, Horio T, Matayoshi T, Yasuda H, Nagura J, Tomoike H, Kawano Y, Miyata T. Association of genetic polymorphisms of endothelin-converting Enzyme-1 gene with hypertension in a Japanese population and rare missense mutation in Preproendothelin-1 in Japanese hypertensives. *Hypertens Res* 2007;30(6) 513-520.
- 2) Kamide K, Kokubo Y, Fukuhara S, Hanada H, Yang J, Kada A, Nagura J, Takiuchi

S, Horio T, Kawano Y, Okayama A, Tomoike H, Miyata T. Protein tyrosine kinase 2 β as a candidate gene for hypertension. *Pharmacogenet Genomics*. 2007; 17(11) 931-939.

- 3) Yasuda H, Kamide K, Takiuchi S, Matayoshi T, Hanada H, Kada A, Yang J, Miwa Y, Yoshii M, Horio T, Yoshihara F, Nakamura S, Nakahama H, Tei C, Miyata T, Kawano Y. Association of single nucleotide polymorphisms in endothelin family genes with the progression of atherosclerosis in patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2007;21(11) 883-892.

2. 学会発表

- 1) 花田裕典、宮田敏行、山本勝広、嘉田晃子、神出計、河野雄平、「GEANE 研究グ

ループ、GEANE 研究(降圧薬感受性遺伝子同定のための多施設前向き臨床試験)ゲノムワイド SNP 遺伝子型決定チップの実際と検体集団の遺伝子的特性」、第 30 回日本高血圧学会総会、平成 19 年 10 月 25 日～27 日、沖縄市

- 2) 神出計、楊進、花田裕典、又吉哲太郎、安田久代、堀尾武史、吉原史樹、中田裕人、中村敏子、中濱肇、宮田敏行、河野雄平、「L 型カルシウムチャンネル a1C ならびに a1D サブユニット遺伝子多型はジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬の降圧効果に関与する」、第 30 回日本高血圧学会総会、平成 19 年 10 月 25 日～27 日、沖縄市

H. 知的財産権の出願・登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業） 分担研究報告書

遺伝子多型検索による高血圧個別化診療の確立に関する研究

分担研究者 花田 裕典 国立循環器病センター研究所 循環分子生理部 室員

研究要旨: SNP 遺伝子型データから、最適な降圧薬を選択する手法を開発する。本研究では、バルサルタン、インダパミド、アムロジピンの3種類の降圧薬を使用した。そこで、(1)ゲノム網羅的に多数の SNP 遺伝子型を決定できるチップを利用し、146 サンプルについて 50 万 SNP の遺伝子型を決定し、(2)サンプルごとに薬の有効性を数値化し、最適な薬剤を選択する新たなアルゴリズムの開発をおこなった。

A. 研究目的

本研究で使用している3種類の降圧薬は高血圧の治療ガイドラインの第一選択に上げられる薬剤で、その使用頻度は高い。これまでにこれらの薬剤の効果と遺伝子型との関連性についていくつか報告されているが、信頼性や再現性は高くない。その原因として、(1) 遺伝子型を解析した遺伝子が少ないことや、解析した遺伝子以外に関連遺伝子が存在すること、(2)薬の有効性を数値化する手法の妥当性について検討が少ないことなどがあげられる。これらの問題を解決するために、(1)についてはゲノム網羅的に多数の SNP 遺伝子型を決定できるチップを利用することが有効であると考えられる。近年、50-100 万 SNP の遺伝子型を解析できる DNA チップが市販され、大量解析に伴う複雑性や計算量の増加も、情報工学的な技術の日常化やソフトウェアの進歩によって、大きな問題ではなくなっており、本研究では 50 万 SNP の遺伝子型を決定する。(2) については、サンプルごとに3種類の薬を使用し、それらの有効性や安全性を数

値化し、遺伝子型データから最適な薬剤をのものを選択するアルゴリズムを開発する。

B. 研究方法

遺伝子型の決定には Affymetrix 社 GeneChip System を使用し、DNA チップには Human Mapping 500K Array Set を使用した。このチップは2枚1セットで、総計 500,447 SNP マーカーの遺伝子型を決定することができる。試薬、操作等については、メーカーの指定や指示書にしたがった。チップの読み取りおよび、変異の決定等は、システムに標準の機器、ソフトウェアを使用した。SNP 遺伝子型の推定には Affymetrix 社 GeneChip システム標準の GTYPE 4.1 の2種類のアルゴリズム、Dynamic Algorithm と BRLMM を使用した。CNV (Copy Number Variation) の推定には CNAT 4.0 を使用した。BRLMM アルゴリズムを使用した遺伝子型決定率が 97% を越えない試料については再解析を行なった。薬の有効性との関連性の解析を容易にするために、SNP 遺伝子型、CNV とともにデータベース化を行った。決定され

た遺伝子型の頻度、LD、HWE (Hardy-Weinberg 平衡)の計算には PLINK 0.99 (pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/)を、LD ブロックの推定には Haploview 4 (www.broad.mit.edu/mpg/haploview/)を使用した。SNP マーカーのアノテーション情報や HapMap の遺伝子型データは National Center for Biological Information 及び Affymetrix 社から取得した。

SNP 遺伝子型や CNV のデータを格納するデータベースライブラリとして SQLite 3.4 (www.sqlite.org)を使用し、データベースの操作等、スクリプトを記述する言語には Ruby 1.8.25 (ruby-lang.org)を使用した。

C. 研究結果および D. 考察

SNP 遺伝子型および CNV の推定
遺伝子型決定のアルゴリズムは Affymetrix 社推奨の Dynamic Algorithm と BRLMM の 2 種類のうち、BRLMM を使用した。Dynamic Algorithm は多数のチップデータを必要とせず、一チップごとに遺伝子型を決定することができる。一方、BRLMM は自己学習的なアルゴリズムで、多数のチップデータ (48 以上)を必要とするが、遺伝子型決定率は Dynamic Algorithm よりも良好だった。Dynamic Algorithm での決定率が 93%以上のチップデータでは BRLMM を使用すると決定率は 4-5%増加し、93%未満のチップデータでは、BRLMM を使用しても決定率が 97%を越えることはなかった。今回は BRLMM を利用して遺伝子型の決定を行い、決定率の平均は 98.8% (S. D. =0.57)だった。常染色体では遺伝子型決定率はほぼ一定であったが、X 染色体では 99.1%と少し高いか

った。これは、女性では性染色体がヘテロ接合型のハプロイドであることが影響していると思われる。解析に利用できない SNP マーカーとして、HWE の p 値が 0.001 未満の SNP マーカー数は 4,456、全体の試料数の 10%以上で遺伝子型が決定できなかったものが 8,873 (1.75%)、頻度が 1%未満のものが 102,290 サイト存在し、臨床データとつぎ合わせて解析に利用できると考えられる SNP マーカーは総計 385,910 と考えられる。CNV は本来、チップによる遺伝子型の副産物の用な扱いであったが、近年、SNP 遺伝子型以外の表現型の有効なマーカーになる可能性も示唆されており、さらに詳細な解析を進めるために、HapMap プロジェクトの集団との比較を行っている。例として Yoruba (Ibadan, Nigeria)の集団と CNV を比較したところ、差があった SNP マーカー数は 2,887 だった。

LD ブロックの推定

LD ブロックは、遺伝子との関連性を解析するとき、データの縮退に有効である。ブロックの推定には Haploview を使用し、D' の 95%信頼区間を指標にする Gabriel (S. B. Gabriel et al., Science 296, 2225-2229, 2002)らの基準を用いて行った。ブロック長の平均は 22.4kbp、中間値は 9.3kbp だった。長さが 100kbp を超えるブロックは 4%、100bp 未満のブロックが約 3%存在し、HapMap プロジェクトから発表されている LD ブロックの分布よりも少し長い。これは、使用したチップ上の SNP マーカーの分布が HapMap よりも粗いことが原因であると考えられる。

臨床データと遺伝子型データとの関連性の解析

現在、統計数理研究所 藤田、江口良教授との共同研究によって、降圧薬の有効性を数値化し、遺伝子型データとの関連性の解析を行うことによって、有効性あるいは安全性の高い薬の選択アルゴリズムの開発をおこなっている。

E. 結論

本研究で収集した検体すべての遺伝子型決定を終了し、LDブロック、CNV等の集団遺伝学的特性について解析を行った。最適降圧剤の選択アルゴリズムを開発については、現在、遺伝子型データと臨床データ間の解析中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato N, Miyata T, Tabara Y, Katsuya T, Yanai K, Hanada H, Kamide K, Nakura J, Kohara K, Takeuchi F, Mano H, Yasunami M, Kimura A, Kita Y, Ueshima H, Nakayama T, Soma M, Hata A, Fujioka A, Kawano Y, Nakao K, Sekine A, Yoshida T, Nakamura Y, Saruta T, Ogihara T, Sugano S, Miki T, Tomoike H. High-density association study and nomination of susceptibility genes for hypertension in the Japanese National Project. *Hum Mol Genet.* 2008; 17(4):617-627.
2. Yasuda H, Kamide K, Takiuchi S,

Matayoshi T, Hanada H, Kada A, Yang J, Miwa Y, Yoshii M, Horio T, Yoshihara F, Nakamura S, Nakahama H, Tei C, Miyata T, Kawano Y. Association of single nucleotide polymorphisms in endothelin family genes with the progression of atherosclerosis in patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2007;21(11):883-892.

- 3) Kamide K, Kokubo Y, Fukuhara S, Hanada H, Yang J, Kada A, Nagura J, Takiuchi S, Horio T, Kawano Y, Okayama A, Tomoike H, Miyata T. Protein tyrosine kinase 2beta as a candidate gene for hypertension. *Pharmacogenet Genomics.* 2007;17(11):931-939.
- 4) Banno M, Hanada H, Kamide K, Kokubo Y, Kada A, Yang J, Tanaka C, Takiuchi S, Horio T, Matayoshi T, Yasuda H, Nagura J, Tomoike H, Kawano Y, Miyata T. Association of genetic polymorphisms of endothelin-converting enzyme-1 gene with hypertension in a Japanese population and rare missense mutation in preproendothelin-1 in Japanese hypertensives. *Hypertens Res.* 2007;30(6):513-520.

2. 学会発表

- 1) 花田裕典、宮田敏行、山本勝広、嘉田晃子、神出計、河野雄平. GEANE研究(降圧薬感受性遺伝子同定のための多施設前向き臨床試験) —ゲノムワイドSNP遺伝子型決定チップの実際と検体集団の遺伝子的特性— 第30回日本高血圧学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業） 分担研究報告書

遺伝子多型検索による高血圧個別化診療の確立に関する研究 —GEANE 研究の解析に関する研究—

分担研究者 嘉田 晃子 国立循環器病センター研究所病因部 室員

研究要旨：降圧薬感受性遺伝子多型を同定することを目的とした GEANE 研究は、3 剤 3 期のクロスオーバーデザインであり、このデザインを考慮し、遺伝子型データとの関連性解析の前段階として、降圧薬の有効性及び特徴を把握し、薬剤の選択アルゴリズムの開発に向けた検討を行った。

A. 研究目的

降圧薬感受性遺伝子多型を同定することを目的とした GEANE 研究は、3 剤 3 期のクロスオーバーデザインである。このデザインを考慮し、遺伝子型データとの関連性解析の前段階として、降圧薬の有効性及び特徴を把握し、薬剤の選択アルゴリズムの開発に向けた検討を行う。

B. 研究方法

本研究の登録は 2007 年 3 月 31 日で終了し、20 施設から 154 名が登録された。データの収集状況を鑑み、血圧データに対して降圧薬の特徴を分析する。解析は、SPSS16.0 または SAS v. 8.02 を用いる。

（倫理面への配慮）

GEANE 研究は、ヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い実施している。

C. 研究結果

本研究の登録は 2007 年 3 月 31 日で終了し、20 施設から 154 名が登録された。現在データの確認、クリーニング中であり、血圧のデータとして評価可能な 85 例について検討を行った。

観察期、3 ヶ月後、6 ヶ月後、9 ヶ月後に測定された血圧データについて、記述統計量を算出し、推移図により変化を把握した。

各 3 ヶ月の服薬終了時には、前の期に服薬した薬剤の効果はないという仮定と、時期による影響はないという仮定をおき、降圧効果の判断基準を設定した場合の薬剤ごとの反応を評価した。

判断基準は、観察期血圧から投与後血圧までの変化について、1) 収縮期血圧が 20mmHg 以上、2) 収縮期血圧が 10mmHg 以上、3) 拡張期血圧が 10mmHg 以上、および 4) 平均血圧が 10mmHg の 4 つを検討した。判断基準ごとに各薬剤の効果があり/なしの 2 値に分類されるため、すべての組み合わせパターンは 8 通りになる。降圧効果の判断基準別タイプ別人数を表 1 に示した。各基準によってタイプ別人数は変化した。基準 1)、

3)の場合には、3剤とも効果あり、または3剤とも効果なしの人数が多かった。一方、基準2)、4)の場合には、3剤とも効果ありの人数が多く、3剤とも効果なしの人数は少なかった。

D. 考察

複数の降圧効果の判断基準を用いた場合のタイプ別人数を評価した。降圧薬感受性遺伝子多型の同定を考えた場合、薬剤ごとに効果が異なるタイプの部分の人数が評価されることになる。降圧薬感受性が表現できる形で、次に行われる遺伝子型データとの関連性の解析へとつなげていく予定である。

なお、今回は85例の部分データの検討であったため、デザインによる前提条件の確認を全体のデータにおいて行う必要がある。

E. 結論

本研究のデザインを考慮し、遺伝子型デ

ータとの関連性解析の前段階として、降圧薬の有効性及び特徴を把握し、薬剤の選択アルゴリズムの開発に向けた検討を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

花田裕典, 宮田敏行, 山本勝広, 嘉田晃子, 神出計, 河野雄平, GEANE 研究グループ. GEANE 研究 (降圧薬感受性遺伝子同定のための多施設前向き臨床試験) —ゲノムワイド SNP 遺伝子型決定チップの実際と検体集団の遺伝子的特性—. 第30回日本高血圧学会

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

表1. 降圧効果の判断基準別タイプ別人数

降圧効果				判断基準			
タイプ	薬剤1	薬剤2	薬剤3	SBP < -20	SBP < -10	DBP < -10	mean BP < -10
a	○	○	○	20	50	18	31
b	○	○	×	9	9	13	12
c	○	×	○	4	5	2	5
d	○	×	×	8	3	10	8
e	×	○	○	11	12	7	10
f	×	○	×	9	4	8	8
g	×	×	○	6	0	8	7
h	×	×	×	18	2	19	4
合計				85	85	85	85

※ 現時点で収集された血圧データを用いる

SBP : 収縮期血圧
DBP : 拡張期血圧
mean BP : 平均血圧

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業） 分担研究報告書

遺伝子多型検索による高血圧個別化診療の確立に関する研究
・降圧薬感受性遺伝子同定のための多施設前向き臨床試験（臨床試験の推進）・

分担研究者 勝谷友宏 大阪大学大学院医学系研究科老年・腎臓内科学 講師

研究要旨：高血圧感受性遺伝子の意義を検証するためには、降圧薬による治療反応性やコホート研究における経時的な臨床指標の変化との関連検証が重要である。今回、GEANE 研究の対象者からの DNA 採血、臨床情報の収集に成功するとともに、自験例サンプルにおいて、 $\beta 2$ アドレナリン受容体の多型とノルエピネフリン高値が、将来の腎機能悪化とインスリン抵抗性出現の予測因子となることを解明した。また日本人におけるゲノム網羅的関連解析により、複数の候補遺伝子および座位を同定した。今後は、これら知見をベースに、現在進行中の HOMED-BP-GENE 研究の結果と本 GEANE 研究成果を併せて解析を進めることが肝要と考えられる。

A. 研究目的

循環器疾患発症予防のためには、個人の体質にあった個別の施策を勘案することが厚生労働行政において重要である。降圧薬は重篤な心血管病予防に一定の効果をあげているが、その投与方法は血圧のみを指標に手探りで行われているのが現状である。本研究では高血圧の発症や進展、降圧薬の反応性や副作用発現と関連する遺伝子の解析を行った。

B. 研究方法

遺伝子解析へのインフォームドコンセントの得られた対象者より、DNA 採血を実施し、TaqMan PCR 法による多型解析ならびに臨床情報収集、関連解析の実施を行った。

（倫理面への配慮）「高血圧および関連合併症の遺伝子解析」および「降圧薬感受性遺伝子同定のための前向き多施設臨床試験（GEANE 研究）」の研究計画は大阪大学ヒト

ゲノム研究倫理委員会による承認を受けている。

C. 研究結果

GEANE 研究については、大阪大学医学部附属病院老年・高血圧内科において 3 症例、関連医療機関において 3 症例の DNA 採血および臨床情報収集に成功し、連結可能匿名化処理後、国立循環器病センターへ検体、データの送付を行い、現在ゲノム網羅的解析が行われている。利尿薬投与後にアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) に切り替えた際に、一過性の血圧上昇を認めた症例など、薬剤感受性の個人差を示唆する所見も得られている。

自施設研究としては、5 年間にわたりインスリン抵抗性指数 (HOMA-R) 等を詳細に検討した集団において、ノルエピネフリン濃度 (NE) を測定し得た症例を選択し、 $\beta 2$ アドレナリン受容体遺伝子

(ADRB2)/Arg16Gly, Gln27Glu 多型との関連性を検討した。5年間の経過中、ADRB2/Gly16 アレル保有者は高いNE値、HOMA-R、体脂肪量、より低いクレアチニン・クリアランス値を示しており、NE値高値かつ ADRB2/Gly16 保有が、将来の腎機能低下とインスリン抵抗性出現の予測因子でアル可能性が示された¹⁾。

D. 考察

GEANE 研究では、症例エントリー数は少なかったものの、全例エントリー期間を完遂することが出来た。少ない症例数の中にも、降圧薬感受性、副作用発現の異なる症例が散見されており、ゲノム網羅的解析との関連が注目される。

本年度解析では、肥満に伴う血圧上昇の遺伝因子と目される ADRB2 の多型解析結果を、5年間にわたる詳細な臨床情報と照合した結果、ノルエピネフリン濃度上昇と ADRB2/Gly16 多型を有することが腎機能悪化とインスリン抵抗性出現の予測因子であることが示された。これら遺伝子多型はβ遮断薬だけでなく、各種降圧薬反応性にも関連する可能性が高く、今後の GEANE 研究参加者における検討が必要と考えられる。またオールジャパン体制で実施され、我々も検体収集、解析に尽力したミレニアム・ゲノム・プロジェクト・高血圧部会のマイクロサテライトマーカーおよび SNPs のゲノムスキャンの結果も論文発表され、ADD2 をはじめとする高血圧感受性遺伝子や座位が明らかにされた。今後は、日本人の高血圧感受性を高めることが示されたこれら遺伝因子と降圧治療反応性、副作用発現、心血管予防効果を検証する必要がある、当施

設では東北大学との共同研究により HOMED-BP-GENE 研究を実施中であり、これまでに 300 症例を越える検体収集に成功し、現在網羅的解析を行っている。今後は GEANE 研究と併せた形での統計学的解析も重要になるものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

E. 結論

疾患感受性遺伝子多型を活用し、個人の体質に応じた予防的介入や予後予測が可能となることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masuo, K, Katsuya T, Sugimoto K, et al. High plasma norepinephrine levels associated with Beta2 -adrenoceptor polymorphisms predict future renal damage in nonobese normotensive individuals. *Hypertens Res* 2007;30:503-511.
- 2) Kato N, Miyata T, Tabara, Y, Katsuya, T, Kamide, K, Kawano Y, Miki T, Tomoike H, et al. High-density association study and nomination of susceptibility genes for hypertension in the Japanese National Project. *Hum Mol Genet* 2008;17(4): 617-627.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものなし。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

遺伝子多型検索による高血圧個別化診療の確立に関する研究

分担研究者 相馬 正義 日本大学医学部内科学系総合内科学分野 教授

研究要旨:本態性高血圧症(EH)に対し、候補遺伝子多型を用いて関連研究を行った。Calcitonin-related peptide α (CALCA) 遺伝子、Natriuretic peptide precursor B (NPPB) 遺伝子、Prostaglandin E2receptor (PTGER2) 遺伝子、Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) 遺伝子、Guanylate cyclase activator 2B (GUCA2B) 遺伝子、Aromatase (CYP19A1) 遺伝子が高血圧症と関連することが判明した。

A. 研究目的

EHの疾患候補遺伝子または候補遺伝子領域の遺伝子多型を用いて関連研究を行い、本研究の基盤となるデータを集積する。

B. 研究方法

- (1) EH患者と正常血圧者を対象とし末梢血からゲノムDNAを抽出した。尚、採血に当たってはヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に準拠し、日本大学医学部倫理委員会で承認された方法に則って書面での同意を得た。
- (2) EH患者のゲノムDNAを用いて、CALCA、NPPB 遺伝子の5' 上流領域の多型をダイレクトシーケンス法で検出した。また、公共データベースからの情報と合わせ、CALCA、NPPB、PTGER2、ALDH2、GUCA2B および CYP19A1 遺伝子領域の遺伝子多型を選出し、TaqMan 法およびダイレクトシーケンス法にてゲノタイプを決定し、関連研究をおこなった。

C. 研究結果

- (1) CALCA 遺伝子上流領域に2-bpの microdeletion を発見し、rs1553005 および rs5241 とハプロタイプを構築したところ、C-AGins-A型が有意 ($p=0.00031$) に EH と相関した。
- (2) NPPB 遺伝子5' 上流領域に TTTC の繰り返し配列(VNTR)を発見した。この VNTR は女性の EH と有意な相関が認められた。
- (3) PTGER2 遺伝子多型 rs17197 は、男性 EH と有意に相関した。
- (4) ALDH2 遺伝子の Lys487Glu 多型は、アルコール摂取とは独立して、EH との相関が認められた。
- (5) GUCA2B 遺伝子多型 rs883062、rs1047047、rs2297566 を用いて関連研究を行った。それぞれの SNPs は、単一では EH との相関を認めなかったが、そのハプロタイプは EH と有意に相関した。
- (6) CYP19A1 遺伝子上の5箇所 SNPs について、関連解析を行い、rs700518 と rs10046 および rs1870049 と rs10046

で構築したハプロタイプが、性特異的にEHと関連することが判明した。

D. 考察

候補遺伝子アプローチ法によって、今回新たに6つの遺伝子領域にEHとの関連が認められた。高血圧症関連遺伝子は多数存在し、これらの実験結果は、異なった集団を用いた研究や異なった方法による更なる検証が必要であるが、本研究で行われる遺伝子網羅的研究結果の解釈の一助となるものと考えられる。

E. 結論

本研究の基礎データとして、新たに6つの遺伝子領域にEHとの関連を発見した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morita A, Nakayama T, Soma M, Mizutani T. Association between the calcitonin-related peptide alpha (CALCA) gene and essential hypertension in Japanese. *Am J Hypertens* 2007;20(5):527-32.
- 2) Kosuge K, Soma M, Nakayama T, Aoi N, Sato M, Izumi Y, Matsumoto K. A novel variable number of tandem repeat of the natriuretic peptide precursor B gene's 5' -flanking region is associated with essential hypertension among Japanese females. *Int J Med Sci.* 2007; 4(3):146-152.

- 3) Sato M, Nakayama T, Soma M, Aoi N, Kosuge K, Haketa A, Izumi Y, Matsumoto K, Sato N, Kokubun S. Association between prostaglandin E2 receptor gene and essential hypertension. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007;77(1):15-20.
- 4) Hui P, Nakayama T, Morita A, Naoyuki Sato N, Hishiki M, Saioto K, Yoshikawa Y, Tamura M, Sato I, Takahashi T, Soma M, Izumi Y, Ozawa Y, Cheng Z. Common single nucleotide polymorphisms in Japanese patients with essential hypertension: aldehyde dehydrogenase 2 gene as a risk factor independent of alcohol consumption. *Hypertens Res* 2007;30:585-592.

2. 学会発表

青井則子、中山智祥、相馬正義、他。インスリン様成長因子1 (IGF1) 遺伝子多型と本態性高血圧症との関連解析。第30回日本高血圧学会総会。他11回。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 未出願
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

遺伝子多型検索による高血圧個別化診療の確立に関する研究

分担研究者 笹栗 俊之 九州大学大学院 医学研究院 臨床薬理学 教授

研究要旨：アドレナリン受容体関連蛋白質の遺伝子多型と β 遮断薬の薬効に関する薬理遺伝学的研究。

A. 研究目的

β アドレナリン受容体遮断薬（以下 β 遮断薬）は、高血圧症・虚血性心臓病・頻脈性不整脈・心不全などの治療薬として広く用いられているが、その薬効には個人差があることが知られている。その原因のひとつとして、アドレナリン受容体関連蛋白質の遺伝子多型が関与が示唆されているが、日本人においては、確立されたエビデンスはない。そこで本研究では健常人を対象に β_1 受容体に特異性の高い遮断薬を投与し、アドレナリン受容体関連蛋白質の遺伝子多型との関連を検討した。

B. 研究方法

書面にてインフォームドコンセントを得られた健常者 210 名を対象とした。気管支喘息、50 回/分未満の徐脈、不整脈を有する者は除外した。4 時間以上空腹の後、二重盲検法にてアテノロールドライシロップ（50mg）およびプラセボを服薬してもらい、薬効は服薬前と服薬 3 時間後に自動血圧計（HEM-7471C, オムロン社）で脈拍数と血圧を測定することにより評価した。また同時に採血を施行し、血球成分より DNA を抽出し、PCR-RFLP 法により既知の β_1 アドレナリン受容体遺伝子多型（S49G, R389G）の解

析をおこない薬効との相関を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究計画は九州大学医学研究院の倫理委員会およびヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査専門委員会に承認されており、対象に対して十分な説明を行った後、書面にて同意を得ている。

C. 研究結果

脈拍数、血圧はともに、服薬後 60 分後よりアテノロール服薬群（136 名）でプラセボ群（74 名）に比べ有意に低下していた。アテノロール服薬群において遺伝子多型解析を行ったところ、S49G、R389G の変異アレル頻度はそれぞれ 0.126、0.219 であった。Ser49Gly 及び Arg389Gly とアテノロール投与による脈拍、血圧の変化（感受性）との相関を検討したが、従来報告されてきたような多型による有意な差を見出すことはできなかった。性別、喫煙等の違いによる解析も行ったが、同様に有意差はなかった。

D. 考察

海外でのこれまでの報告では細胞レベルで 389R が他の遺伝子多型と比べ、 β_1 受容体に対して高い親和性を有しているという報告（Sandilands et al.

Pharmacogenetics)があり、人でもSG/RRが他のハプロタイプに比べ β_1 受容体遮断薬が効きやすいと報告されている。しかしながら、今回の我々の結果ではこのような傾向はみられなかった。対象が若年健康者であったことが原因かもしれないが、日本人では遺伝子多型の影響が軽微である可能性もあり、バイアスの少ない高血圧患者を対象とした更なる試験が必要と考えられた。

E. 結論

β_1 アドレナリン受容体遺伝子多型(S49G, R389G)は、日本人若年健康者において、 β 遮断薬の薬効に影響をおよぼさないと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

遺伝子多型検索による高血圧個別化診療の確立に関する研究

分担研究者 土橋 卓也 国立病院機構九州医療センター 内科医長

研究要旨：高血圧外来患者では高率にメタボリック症候群を合併していた。メタボリック症候群合併高血圧者は尿中食塩排泄量が多く、服薬降圧薬数も多いことから、治療抵抗性と考えられた。

A. 研究目的

高血圧外来患者を対象としてメタボリック症候群（MS）の頻度とその特徴について検討する。

B. 研究方法

高血圧外来患者を対象として腹囲測定、血液化学検査を行ってMSの有無を評価し、同時に24時間家庭蓄尿を行って尿中食塩排泄量を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究の詳細について対象者に説明し、インフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

対象者290例（平均64歳、男性123例、女性167例）の中でMSの診断基準となる内臓肥満を有する者は男性の63%、女性の39%と高率であり、MSと診断されたものは男性の39%、女性の18%であった。MS合併者は非合併者に比し尿中食塩排泄量が多く（10.1 v s 8.5g/日）、服用降圧薬も多かった。さらに男性MSの50%に高尿酸血症を認めた。MS合併者では外食の頻度が高く、積極的な野菜・果物摂取の意識が低かった。

D. 考察

MSが心血管病のリスクとなることが強調されている。本研究の結果、MS合併高血圧では食塩摂取量が多く、降圧薬を多く必要とし、さらに高尿酸血症合併も多いことが明らかとなった。すなわち、MS合併高血圧は治療抵抗性でかつ多面的なリスク管理が重要と思われる。

E. 結論

メタボリック症候群は高血圧外来患者に高頻度に合併しており、高尿酸血症の頻度も高いことより減塩、カリウム摂取、体重減少、運動などの生活習慣の修正に加えて降圧薬、脂質低下薬、尿酸低下薬などの適正な使用により厳格かつ多面的危険因子の管理が必要と思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohta Y, Tsuchihashi T, et al : Prevalence and lifestyle characteristics of hypertensive patients with metabolic s