

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連  
遺伝子の多型探索及びそのテーラーメイド投薬への応用

平成17～19年度 総合研究報告書  
(H17-ファーマコ-一般-004)

主任研究者 齋藤 嘉朗

平成20(2008)年3月

目 次

I. 総合研究報告

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型探索及び  
そのテーラーメイド投薬への応用 ----- 1  
齋藤 嘉朗

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 21

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 25

# I. 総合研究報告

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型探索  
及びそのテーラーメイド投薬への応用

主任研究者 齋藤嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長

研究要旨： インスリン分泌促進型経口糖尿病薬、特にスルホニルウレア剤（SU 剤）の薬効最適化とその持続を目指して、患者毎の遺伝子型に基づく投薬法（投薬量及び薬物選択法）を確立することを目的とする。一次無効との相関解析関連では、第 3 世代の SU 剤グリメピリドを投与された検体 134 例を対象に、その体内代謝・動態・作用点関連 8 遺伝子の多型解析において約 500 多型を見だし、さらにハプロタイプ解析によりタグ多型を同定した。また代謝に関連する CYP2C9 や CYP2C19 等の 4 遺伝子の新規同定多型 12 種につき、*in vitro* 機能解析を行い、6 多型が活性低下を示すことを明らかにし、本情報を患者検体との相関解析に用いた。最終的に、解析した 8 遺伝子のハプロタイプ中 3 種が単相関解析でグリメピリドの有効性（HbA<sub>1c</sub> 値の減少率）と有意に相関し、さらに多変量解析により、このうちの 2 ハプロタイプと 4 種の患者背景因子が有意な説明変数となり、一次無効（薬効）予測モデルを確立した。二次無効との相関解析関連では、二次無効の発現機構が不明であるため、*in vitro* で確立した SU 剤によるインスリン分泌障害モデルを用い、二次無効を起こしやすい SU 剤と起こしにくい SU 剤により誘導が異なる遺伝子を DNA チップで検索し、さらに実際のインスリン分泌への影響を遺伝子発現ノックダウンにより実証し、3 種の遺伝子が SU 剤によるインスリン分泌障害に関与することを示唆する結果を得た。二次無効群、長期有効群（対照群）、早期無効群の検体（計 389 例）を用いた相関解析では、ゲノム網羅的遺伝子多型解析を、SU 剤長期有効患者 140 名、二次無効患者 71 名に関して行った結果、100 種の多型が  $p < 0.001$  で二次無効と相関した。これらの中には、アポトーシス関連のシグナル伝達分子、脂質代謝に関与する分子、蛋白質分解酵素等をコードする遺伝子の領域内または、その近傍に位置する多型が含まれていた。また log Quantile-Quantile p-value plot による多重比較法において 4 種の多型が二次無効発現と有意に相関した。また候補遺伝子多型解析では、主として、SU 剤有効 11 年以上の長期有効患者 130 名及び SU 剤使用 10 年以内でインスリン治療に移行した二次無効患者 42 名というフェノタイプが大きく異なるサブグループ間で、約 40 遺伝子 115 多型のアリル頻度等を比較し、単相関解析で 11 種の有意に異なる多型を見いだした。さらに本研究で相関が明らかとなった多型を用いて多変量解析を行い、4 種の遺伝子多型が説明因子となる二次無効予測モデルを確立した。

分担研究者

国立国際医療センター研究所

代謝疾患研究部長

安田 和基

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科准教授 埴岡 伸光

国立医薬品食品衛生研究所

## A. 研究目的

本邦の糖尿病患者は約900万人に達する。糖尿病は治癒することはなく、失明・腎症等の合併症を引き起こす。2型糖尿病の治療にはインスリン分泌促進型経口糖尿病薬が繁用されている。しかし、低血糖等の副作用や、一定の割合で投与初期から十分な薬効が得られない「一次無効」が起こり、また一旦は薬効が得られたものの長期連用により薬効が消失する「二次無効」が約2割で発生し临床上問題となっている。これらには遺伝因子の関与も示唆されているが、相関する遺伝子多型の報告は極めて少ない。

本研究はインスリン分泌促進型経口糖尿病薬、特にスルホニルウレア剤（以下、SU剤）の薬効最適化とその持続の予測法（予測モデル）を確立するため、新規候補遺伝子探索、候補遺伝子及び網羅的遺伝子多型解析、新規同定多型の機能解析等を行う。これらにより、患者毎の背景因子や遺伝子型に基づく投薬法（投薬量及び薬物選択法）を確立することを目的とする。

一次無効（投与初期の有効性確保）については、第3世代のSU剤グリメピリドを対象とし、その体内代謝・動態・作用点関連遺伝子の多型を主としてシーケンシングにて同定した。新規遺伝子多型に関しては、酵母細胞または哺乳動物細胞で変異型蛋白質を発現して *in vitro* で機能解析を行い、活性影響を確認して、多型の相関解析に用いた。薬効評価項目（応答変数）として、糖化ヘモグロビン値（HbA<sub>1c</sub>値）の減少率を用い、ハプロタイプとの相関解析及びモデルの作製を行った。

二次無効関連では、その発現機構が不明

であるため、まず二次無効を起こしやすいグリベンクラミドの長時間前処理によるインスリン分泌障害モデルを、膵β細胞株 INS-1D を用いて *in vitro* にて確立し、DNAチップにて発現が変化する遺伝子を同定した後、さらに siRNA を用いた発現ノックダウンにより機能的関与を実証した。患者検体としては、長期有効患者、二次無効患者、早期無効患者、計 389 例の臨床パネルを作製し、遺伝子多型解析に供した。ゲノム網羅的遺伝子多型解析は約 26 万箇所の多型を解析しうるアフィメトリクス 250K アレイにて、候補遺伝子多型解析はインスリン分泌及び膵臓β細胞の機能維持に重要な約 40 遺伝子に関し、主としてタイピング（一部シーケンシング）にて解析した。

## B. 研究方法

### I 一次無効関連

1) グリメピリド投与検体の臨床パネル（一次無効解析用）

膵外作用を有し、今後使用頻度が高くなると予想される第三世代の SU 剤、グリメピリドを対象に選択し、分担研究者である国立国際医療センター研究所・安田和基部長及び協力研究者である国立医薬品食品衛生研究所・頭金正博室長を通じて練馬総合病院より供与頂いた、計 134 例を解析に供した。

2) シーケンシングによる遺伝子多型同定、連鎖不平衡解析、及びハプロタイプ解析

グリメピリドの体内代謝・動態・作用点関連遺伝子である 7 遺伝子のシーケンシングの概略は以下の通りである。対象領域はエクソン部分およびその近傍のイントロン部分、並びに既知のプロモーター領域及び

エンハンサー領域とした。ゲノム DNA を用いて、ミックスプライマー法 (*CYP2C9*, *CYP2C19*) またはロングレンジ PCR 法 (*ABCC8*, *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCC9*) にて増幅を行った。なお、エクソン数が少ない *KCNJ11* については、1 段目の PCR 反応は行わなかった。第 2 段目の PCR 反応は各エクソン (領域) を増幅するために行った。PCR 産物を精製後、サイクルシーケンシング反応を行い、配列を解析した。

連鎖不平衡解析はソフトウェア SNPalyze ver. 7.0 (Dynacom, Yokohama, Japan) により行い、 $|D'|$  値および  $r^2$  値で連鎖の強さを評価した。またハプロタイプ解析をソフトウェア LDSUPPORT (Kitamura Y. et al., *Ann. Hum. Genet.* 66: 183-193 (2002)) により行った。

### 3) タイピング系の開発

*ABCG2* について、ハプロタイプ解析結果に基づき、パイロシーケンシング法による簡便なタイピング系を開発し、患者検体の解析に利用した。対象は頻度約 3% の以上のハプロタイプのタグ多型とした。まず各多型部位を含む断片をビオチン標識プライマーを用いてゲノム DNA より増幅した。PCR 産物をストレプトアビジンビーズに結合させ、アルカリ処理にて 1 本鎖化後、シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、これをミニシーケンシングして多型を解析した。

### 4) 新規遺伝子多型の機能解析

#### a) *CYP2C9* の新規遺伝子多型の機能解析

野生型及び 7 種の変異型 *CYP2C9* (*Leu17Ile*, *Lys118ArgfsX9*, *Thr130Arg*, *Arg150Leu*, *Gln214Leu*, *Pro279Thr*, *Ala477Thr*) の発現プラスミドを調製後、COS-1 細胞にトランスフェクションし、そ

のマイクロソーム画分を調製した。また、別途、mRNA 定量のため全 RNA 画分を調製した。陰性対照として空ベクターのみをトランスフェクションしたものを同様に調製した。

mRNA レベルの定量は、逆転写後、TaqMan 法により行い、 $\beta$ -actin mRNA レベルで補正した。蛋白質レベルの測定はイムノプロットングにより行い、*CYP2C9* の発現量が既知のマイクロソーム画分と比較することにより定量した。酵素活性測定は *CYP2C9* の典型的基質であるジクロフェナクの 4'-水酸化反応を測定し、速度論的解析を行った。

#### b) *CYP2C19* の新規遺伝子多型の機能解析

野生型 (*CYP2C19\*1C*、*Ile331Val*、*CYP2C19.1B* 蛋白をコード)、*CYP2C19\*18* (*Arg329His* / *Ile331Val*、*CYP2C19.18*) 及び *CYP2C19\*19* (*Ser51Gly* / *Ile331Val*、*CYP2C19.19*) cDNA を調製した。これら野生型及び変異型 *CYP2C19* cDNA を pGYR I (酵母細胞発現ベクター、酵母の P450 oxidoreductase cDNA を組み込み済) ヘサブクローニングした後、酵母細胞 *Saccharomyces cerevisiae* AH22 株を形質転換し、マイクロソーム画分を調製した。陰性対照として pGYR I のみをトランスフェクションしたものを同様に調製した。

*CYP* 含量 (ホロ蛋白質レベル) は、還元型 CO 差スペクトルを測定して算出した。またホロ+アポ蛋白質レベルはイムノプロットングにより測定した。*S*-メフェニトイン 4'-水酸化活性は、Hanioka らの方法 (*Drug Metab. Dispos.*, 30: 391-396 (2002)) に準じて測定した。また、オメプラゾール 5-水酸化活性は、Yamazaki らの方法 (*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 283: 434-442 (1997))

に準じて測定した。速度論的解析は、Michaelis-Menten プロット及び Eadie-Hofstee プロットを作成し、 $K_m$  及び  $V_{max}$  値を算出した。*In vitro* クリアランス値は  $V_{max}/K_m$  とした。

#### c) CYP2C8 の新規遺伝子多型の機能解析

アミノ酸置換を伴う新規遺伝子多型 CYP2C8\*X 及び CYP2C8\*Y の cDNA は、野生型である CYP2C8\*1A を鋳型にして部位特異的変異導入法により調製した。配列確認後、これら計 3 種のインサート DNA を精製した。酵母発現用ベクター pGYR I に、本野生型及び変異型 CYP2C8 cDNA をライゲーションし、大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換した。さらに、本ベクターを用いて酵母細胞 AH22 株を形質転換し、ミクロソーム画分を調製した。陰性対照として pGYR I のみをトランスフェクションしたものを同様に調製した。

CYP 含量 (ホロ蛋白質レベル) は、ミクロソーム画分を用いた還元型 CO 差スペクトルにより、ホロ+アポ蛋白質レベルはイムノプロットングにより、それぞれ算出・測定した。野生型および変異型 CYP2C8 の酵素活性は、パクリタキセル 6 $\alpha$ -水酸化活性を、Soyama らの方法 (Soyama et al., Biol Pharm Bull. 24: 1427-1430 (2001)) に準じて測定した。

#### d) HNF4A の新規遺伝子多型の機能解析

野生型 HNF4A (1 型及び 2 型) cDNA をクローニングした (1-WT, 2-WT) 後、2 つの連鎖する遺伝子変異 (1154C>T (A385V) 及び 1193T>C (M398T)) を導入した (1-Mutant, 2-Mutant)。また cDNA を挿入していない Blank ベクターも調製した。配列確認後、これら計 5 種を哺乳動物発現用ベク

ターに組換えた。レポーターベクターとしては、HNF1A のプロモーター領域 (HNF4 $\alpha$  結合部位を含む) を挿入したものを調製した。

蛋白質発現レベルはイムノプロットングにより測定した。HNF4 $\alpha$  転写活性の測定は、HNF4 $\alpha$  発現ベクターおよびレポーターベクターを COS-7 細胞に同時トランスフェクションし、24 時間培養後、野生型および変異型 HNF4 $\alpha$  の転写活性を測定した。転写活性はそれぞれの細胞におけるホタルルシフェラーゼ活性 (Fluc) と ウミシイタケルシフェラーゼ活性 (Rluc) の比 (Fluc/Rluc) として表した。

#### 5) 一次無効との相関解析

薬効評価項目 (応答変数) として、グリメピリドの投与開始時及び投与 4 ヶ月後における糖化ヘモグロビン値 (HbA<sub>1c</sub> 値) (%) より、投与後 4 ヶ月での HbA<sub>1c</sub> 値の減少率を算出し解析に用いた。これと、シーケンシング解析を行った CYP2C9, CYP2C19, ABCC8, KCNJ11, ABCC1, ABCC3、及びタイピングを行った ABCG2 につき、主としてハプロタイプ (タグ多型) を用いて相関解析した。なお 134 名分の患者検体の多型解析を行ったが、上記 HbA<sub>1c</sub> の減少率を算出できたのは、89 名の患者であった。

## II 二次無効関連

1) 新規候補遺伝子探索のための、膵  $\beta$  細胞における SU 剤によるインスリン分泌障害モデル作製とその解析

a) SU 剤による膵  $\beta$  細胞分泌障害モデルにおける遺伝子発現変化の解析

培養株の中でも生理的な  $\beta$  細胞にその性質が近いとされる、ラット INS-1D 細胞を

用いて、1) 血糖降下作用は最も強力である一方、二次無効を最もきたしやすいとされるグリベンクラミド ( $1\mu\text{M}$  or  $10\mu\text{M}$ )、2) 最も古典的な SU 剤で作用の持続はグリベンクラミドより短いトルブタミド ( $100\mu\text{M}$ )、3) 「第三世代」の SU 剤グリメピリド ( $10\mu\text{M}$ )、4) 速効型インスリン分泌促進剤レパグリニド ( $1\mu\text{M}$ )、でそれぞれ 16 時間処理した。インスリン分泌量は、上記の処理を行い、洗浄後、30 分プレインキュベーションを行い、さらに各ウェルに刺激メディウムを加えて  $37^\circ\text{C}$  で 60 分インキュベーションし、その上清を回収してインスリン ELISA 測定キットで測定した。刺激メディウムとしてはグルコース  $3\text{mM}$  (以下 G3)、 $25\text{mM}$  (G25) 及び  $\text{KCl}$   $30\text{mM}$  (K30) を用いた。細胞は、酸エタノール溶液で処理し、インスリン含量アッセイに供した。また別途、細胞より全 RNA を抽出し、Affymetrix 社 GeneChip システム・Rat Genome 2.0 Array (約 3 万転写産物) にて遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、グリベンクラミドによるグルコース反応性インスリン分泌 (Glucose-stimulated insulin secretion, 以下 GSIS) 障害モデルで特異的に発現が変化する遺伝子、その逆に GSIS が保たれるモデルでのみ発現が変化する遺伝子、を選定した。

#### b) siRNA を用いた発現抑制

それぞれの遺伝子に対し、それぞれ 3 種の siRNA を作成し INS-1D 細胞へ導入した。最終 siRNA 濃度は、 $10\text{nM}$  とした。24 時間後に RNA を回収して、TaqMan 法により、該当遺伝子の発現をコントロール siRNA 導入細胞と比較した。50%以上のノックダウンがみられた siRNA について、各遺伝子 2 種ずつを選び、改めて INS-1D 細胞へ導入

し、72 時間後にバッチインキュベーション法によりインスリン分泌を検討した。刺激メディウムとしては、上記、G3、G25 及び K30 を用いた。上清を完全に除いた後、細胞を回収し、インスリン含量アッセイに供した。また、上記遺伝子のノックダウンの効果を、グリベンクラミド処理 GSIS 障害モデルにおいて検討するため、siRNA を投与して 56 時間後に、SU 剤を含む培地に交換し、16 時間インキュベートした後 (siRNA 投与後 72 時間になる)、やはりバッチインキュベーション法により、インスリン分泌を検討した。

#### 2) 患者検体の解析

##### a) 二次無効解析用臨床パネルの作製

検体は、分担研究者である国立国際医療センター研究所・安田和基部長より、供与頂いたもの (計 389 検体) を使用した。「二次無効群」は「3 年以上 SU 剤を使用しインスリン治療に移行した」群、「長期有効群 (対照群)」は「5 年以上 SU 剤を使用し現在もインスリン治療へ移行していない」群、「早期無効群」は「SU 剤使用期間が 3 年未満でインスリン治療に移行した」群である。

##### b) ゲノム網羅的遺伝子多型解析

長期有効群 (対照群) 及び二次無効群の検体を対象に、Affymetrix 社 Gene Chip Human Mapping 250K Nsp Array を用いてゲノム網羅的遺伝子多型解析を継続した。即ち、ゲノム DNA  $250\text{ng}$  を制限酵素 Nsp I で処理し、アダプターをライゲーションした。アダプターを付加した DNA フラグメントを PCR 増幅後、アガロースゲル電気泳動にて  $250\text{-}2000\text{bp}$  のサイズのフラグメントが優先的に増幅していることを確認した。精製

した PCR 産物を定量し、その一部を DNase I で処理した。アガロースゲル電気泳動にて 180 bp 以下のサイズに断片化されたことを確認し、さらに末端標識した。標識した鋳型 DNA を含むハイブリダイゼーションカクテルを 49°C で 17 時間インキュベートして、アレイにハイブリダイズさせた。アレイを洗浄・染色後、専用スキャナーにて蛍光画像を解析した。各プローブのシグナル強度を算出し、Dynamic Model (DM) アルゴリズムにより各アレイのアレル判定率を評価し、93% 以上の場合のみ Bayesian Robust Linear Model with Mahalanobis distance classifier (BRLMM) アルゴリズムを用いてクラスタリング解析を行い、得られたジェノタイプを最終判定結果とした。

全タイピングデータは、関連解析ツール GQuest (Stargen, Tokyo, Japan) により (A) 「各多型につきアレル判定率が 90% 以上であり」、かつ (B) 「Fisher の正確確率検定を用いた Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) 法則への適合度検定により  $p > 0.05$  (多重性は Bonferroni により補正)」、かつ (C) 「minor allele frequency (MAF) が 5% 以上であること」の 3 つの条件でフィルタリングを行い、全てを満たす多型を関連解析に用いた。なお、二次無効群及び長期有効群 (対照群) の各群別の HWE 法則への適合性は SNPalyze により評価した。

相関解析には、GQuest を使用し、アレルの個数に基づく傾向性の有無をコクラン・アーミテージ検定により検定した。さらに (1) 対立遺伝子 (Allele) モデル、(2) 共有性 (codominant) モデル、(3) 優性 (dominant) モデル、(4) 劣性 (recessive) モデルに対するカイ二乗検定または Fisher の正確確率検定により p 値を算出した。多重比較法として、log Quantile-Quantile (QQ) p-

value plot を用いた。相関解析における検出力の算出には、GdesignPlus (Stargen) またはフリーソフトウェアの R を使用した。

### c) 候補遺伝子多型解析

#### c-1) シーケンシングによる遺伝子多型同定

*HNF4A*, *TNFAIP3*, *IPF1*, *HMOX1*, *TXNIP*, *GLRX* 等のシーケンシングの概略は以下の通りである。対象領域はエクソン部分およびその近傍のイントロン部分、並びに既知のプロモーター領域及びエンハンサー領域とした。ゲノム DNA を用いて、ミックスプライマー法 (*HNF4A*) またはロングレンジ PCR 法 (*HMOX1*, *TNFAIP3*, *TXNIP*, *GLRX*, 等) にて増幅を行った。なお、エクソン数が少ない *IPF1* については、1 段目の PCR 反応は行わなかった。第 2 段目の PCR 反応は各エクソン (領域) を増幅するために行った。PCR 産物を精製後、サイクルシーケンシング反応を行い、配列を解析した。

連鎖不平衡解析はソフトウェア SNPalyze により行い、 $|D'|$  値および  $r^2$  値で連鎖の強さを評価した。またハプロタイプ解析をソフトウェア LDSUPPORT により行った。

#### c-2) タイピング系の開発

*TNFAIP3*, *IAPP*, *HMOX1*, *IPF1*, *GCLM*, 等について、ハプロタイプタグ多型等のパイロシーケンシング法による簡便なタイピング系を開発し、患者検体の解析に利用した。対象は頻度約 3% の以上のハプロタイプのタグ多型、計 38 種とした。まず各多型部位を含む断片をビオチン標識プライマーを用いてゲノム DNA より増幅した。PCR 産物をストレプトアビジンビーズに結合させ、アルカリ処理にて 1 本鎖化後、シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせた。これをミニシーケンシングして多型を解析し

た。

またその他の約 35 遺伝子のタイピングは、TaqMan 法にて行った。

### c-3) 二次無効と候補遺伝子多型との相関解析

長期有効患者 290 名、二次無効患者 83 名、早期無効患者 16 名分の検体のうち、抗グルタミン酸デカルボキシラーゼ抗体陽性が疑われる患者等を除き、長期有効群（対照群）278 名、二次無効群 80 名、早期無効群 15 名分を、相関解析に供した。また SU 剤有効 11 年以上の長期有効群 130 名（SU 剤使用歴 17±4 年、中央値±四分位偏差）及び SU 剤使用 10 年以内でインスリン治療に移行した二次無効群 42 名（6±2 年）という、フェノタイプの差が大きいサブグループの検体間でも解析を行った。なお、サブグループ間では、SU 剤使用歴（および現在の HbA<sub>1c</sub> 値）を除き、患者背景因子において有意な差は認められなかった。相関解析対象遺伝子としては、*SLC30A8*, *TCF7L2*, *PPARG*, *HHEX*, *IGF2BP2* 等の 2 型糖尿病との相関が示された遺伝子、及びインスリン分泌、酸化ストレス、アポトーシス関連等の計約 40 遺伝子の約 115 多型であり、アリル頻度およびゲノタイプ頻度の差を中心に解析した。また統計解析は、Fisher の正確確率検定を Prism ver. 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) または SNPalyze で、多変量解析を JMP ver. 6.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) により行った。

#### （倫理面への配慮）

本研究は患者検体由来のヒトゲノム DNA を対象にし、遺伝子多型解析を行うと共に、臨床データを取り扱うものであり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指

針」及び「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、研究倫理審査委員会の承認のもとに行った。

## C. 研究結果

### I 一次無効関連

#### 1) シーケンシングによる遺伝子多型同定、連鎖不平衡解析、及びハプロタイプ解析

各遺伝子での解析結果は以下の通りである。

a) *CYP2C9* : SU 剤の体内代謝に関与する。32 種の新規を含む 62 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは新規の 7 種を含む 9 種類であった。1 ブロックとしてハプロタイプを解析し、46 種のハプロタイプを推定した。さらに頻度約 3% 以上のもの 5 種を同定するためのタグ多型 4 種を選定した。

b) *CYP2C19* : SU 剤の体内代謝に関与する。27 種の新規を含む 48 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは新規の 4 種を含む 7 種類であった。1 ブロックとしてハプロタイプを解析し、31 種のハプロタイプを推定した。さらに頻度約 3% 以上のもの 5 種を同定するためのタグ多型 5 種を選定した。

c) *ABCC8* 及び *KCNJ11* : SU 剤の作用点複合体を形成する。*ABCC8* では 55 種の新規を含む 111 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは新規の 6 種を含む 8 種類であった。*KCNJ11* では 11 種の新規を含む 21 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは既知の 2 種類であった。これら 2 種の遺伝子は染色体上で近傍に位置しているため、一緒に連鎖不平衡解析を

行い、4 ブロックに分割後、ハプロタイプ解析を行った。ブロック 1 では 30 種類を、ブロック 2 で 17 種類を、ブロック 3 では 36 種類を、ブロック 4 (*KCNJ11* を含むブロック) では 34 種類を、それぞれ推定した。さらに頻度約 3%以上のハプロタイプを同定するためのタグ多型も選定した。

d) *ABCC1* : SU 剤の体内動態に関与する可能性が示唆されている。31 種の新規を含む 86 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは 11 種であり、うち新規は 8 種であった。5 ブロックでハプロタイプを解析した。ブロック-1 は 5'-非翻訳領域の GCC の繰り返しより構成されており、12 種が同定された。ブロック 1, 2, 3, 4 ではそれぞれ、32 種、23 種、23 種、13 種のハプロタイプが推定された。このうち頻度約 5%以上のものは、それぞれ 5 種、6 種、5 種、6 種であった。

e) *ABCC3* : SU 剤の体内動態に関与することが示唆されている。21 種の新規を含む 46 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは 6 種であり、うち新規は 5 種であった。新規のうち、2 種はナンセンス変異及びフレームシフト変異であり、機能消失の可能性が示唆された。本遺伝子では、多型間の連鎖が複雑であり、区分された連鎖不平衡ブロックでのハプロタイプ解析は困難であった。

## 2) タイピング系の開発

*ABCG2* のハプロタイプタグ多型 9 種につき、開発したパイロシーケンシング法によるタイピングを試みたところ、解析した全ての多型及び検体につき明瞭なタイピング結果が得られた。また本結果は、直接シー

クエンス法による結果と完全に一致した。

## 3) 新規同定多型の機能解析

### a) *CYP2C9* の新規遺伝子多型の機能解析

空ベクター、野生型及び 7 種の変異型につき、発現及び活性レベルの解析を行った。まずイムノブロットングにて蛋白発現レベルを解析した。*Lys118ArgfsX9* では蛋白質が検出できなかったが、野生型及び他の 6 種の変異型では同程度の発現が認められた。一方、mRNA 発現レベルは野生型及び 7 種の変異型間で有意な差は認められなかった。最後にジクロフェナクの 4'-水酸化活性を測定したところ、まず *Lys118ArgfsX9* では代謝物の生成が認められなかった。一方、他の 6 種の変異型の中では、野生型に比して、 $K_m$  値については *Gln214Leu* 及び *Ala477Thr* で有意な上昇が、P450 当たりの  $V_{max}$  値では *Thr130Arg* で有意な低下が、それぞれ認められ、P450 当たりのクリアランス ( $V_{max}/K_m$ ) 値についても *Thr130Arg*、*Gln214Leu* 及び *Ala477Thr* で有意な低下が認められた。一方、*Leu171Ile*、*Arg150Leu* 及び *Pro279Thr* における各パラメーター値は野生型と同様であった。

### b) *CYP2C19* の新規遺伝子多型の機能解析

酵母細胞で発現させた野生型及び変異型 *CYP2C19* ホロ+アポ酵素蛋白質の発現レベルは、野生型に比して *CYP2C19.18* 及び *CYP2C19.19* では、それぞれ 171%及び 57%であった。また、還元型 CO 差スペクトルによるホロ蛋白質発現レベルは、*CYP2C19.18* では、野生型の約 2 倍高かったのに対し、*CYP2C19.19* では野生型の 65%であり、共に有意差が認められた。

野生型及び変異型 *CYP2C19* の詳細な酵素化学的特性を明らかにするため、S-メフェ

ニトイン 4'-及びオメプラゾール 5-水酸化反応の速度論的解析を行った。

S-メフェニトイン 4'-水酸化反応では、CYP2C19.19 の  $K_m$  値は野生型 CYP2C19 と比較して約 3 倍と有意に高かったが、CYP2C19.18 では野生型 CYP2C19 との間に有意な差は見られなかった。ミクロソーム蛋白量及び CYP 含量 (ホロ蛋白質量) 当たりの CYP2C19.19 の  $V_{max}$  値は、野生型との間に有意な差はなかったが、 $V_{max}/K_m$  値は野生型 CYP2C19 に比べミクロソーム蛋白量当たりでは 29%、CYP 含量当たりでは 47%と有意に低かった。一方、CYP2C19.18 の  $V_{max}$  及び  $V_{max}/K_m$  値は、いずれの単位量当たりにおいても、野生型 CYP2C19 との間に有意な差は認められなかった。

オメプラゾール 5-水酸化反応では、CYP2C19.19 の  $K_m$  値は野生型のそれと比較して約 1.4 倍と有意に高かったが、CYP2C19.18 では野生型 CYP2C19 との間に有意な差は認められなかった。ミクロソーム蛋白量当たりの  $V_{max}$  値及び  $V_{max}/K_m$  値は、CYP2C19.18 及び CYP2C19.19 いずれの変異型 CYP2C19 においても野生型 CYP2C19 との間に有意な差は認められなかった。CYP 含量当たりでは、CYP2C19.19 の  $V_{max}$  値は野生型 CYP2C19 の 1.8 倍と有意に高く、CYP2C19.18 の  $V_{max}/K_m$  は 66%まで減少した。

#### c) CYP2C8 の新規遺伝子多型の機能解析

酵母細胞で発現させた野生型及び変異型 CYP2C8 酵素蛋白質 (ホロ+アポ酵素) のミクロソーム画分における発現レベルは、野生型、CYP2C8.X 及び CYP2C8.Y でほぼ同程度であった。また、ミクロソーム画分を用いた還元型 CO 差スペクトルによるホロ酵素含量の測定において、野生型及び

CYP2C8.X では 450 nm に吸収極大が認められ、機能性 CYP 含量はそれぞれ 26.4 及び 10.6 pmol/mg protein であった。一方、CYP2C8.Y では 450 nm における吸収極大のピークは全く認められなかった。次に、野生型及び変異型 CYP2C8 の酵素活性を解析するため、CYP2C8 発現ミクロソームのパクリタキセル 6 $\alpha$ -水酸化活性を測定した。野生型 CYP2C8 の基質濃度 10  $\mu$ M におけるパクリタキセル 6 $\alpha$ -水酸化活性は、4.68 pmol/min/CYP であった。CYP2C8.X の活性は野生型 CYP2C8 とほぼ同程度であったが、CYP2C8.Y では全く活性は検出されなかった。

#### d) HNF4A の新規遺伝子多型の機能解析

COS-7 細胞で発現させた HNF4 $\alpha$ 蛋白質 (1-WT、1-Mutant、2-WT 及び 2-Mutant) の細胞ライセート画分における発現をイムノブロットングにより確認した。野生型及び変異型 HNF4 $\alpha$ の転写活性 (Fluc/Rluc) は、HNF4 $\alpha$ の 1 型及び 2 型のいずれにおいても、野生型と変異型の間で有意な差は認められなかった (1 型,  $p=0.059$ ; 2 型,  $p=0.136$ )。

#### 4) 一次無効との相関解析

これまでに収集した 134 検体のうち、グリメピリドの投与開始後 4 ヶ月での HbA<sub>1c</sub> 値の減少率が算出可能であった 89 検体につき、CYP2C9, CYP2C19, ABCC8, KCNJ11, ABCC1, ABCC3, ABCG2 のハプロタイプ (ABCC3 のみ多型) との相関解析を行った。解析の結果、3 種の遺伝子のハプロタイプが、HbA<sub>1c</sub> 値の減少率と有意な相関を示した。相関が認められた 3 種の遺伝子のハプロタイプと患者背景因子を説明変数として多変量解析を行ったところ、2 種のハプロ

タイプが説明変数となった。この他の説明変数としては、投与開始時の HbA<sub>1c</sub> 値、SU 剤の投与履歴、等の計 4 種が挙げられる。これらを全て含んだ場合の R<sup>2</sup> 値は 0.663 となり、比較的良い予測モデルとなった。

## II 二次無効関連

1) 新規候補遺伝子探索のための、膵β細胞における SU 剤によるインスリン分泌障害モデル作製とその解析

### a) インスリン分泌障害モデルの作製

本モデル系において、インスリン含量当たりの分泌量に関し、G3 に比べて G25 では、5-6 倍程度インスリン分泌が増加し、いわゆるグルコース反応性 (GSIS) がみられた。一方各 SU 剤処理群では、G3 (basal) の分泌にはあまり変化が見られなかったが、1 μM、10 μM のグリベンクラミド及びグリメピリドでは、G25 の反応性が低下していた。二次無効を生じにくいトルブタミドでは、比較的 GSIS が保たれていた。一方レパグリニドでは若干 G3 (basal) が上昇し、GSIS はほとんどみられなかった。

また mRNA 発現量の比較では、十分な再現性をもって変動している転写産物が比較的多く見られた。GSIS 障害を生じた 10 μM グリベンクラミド処理群で発現が変化した遺伝子群と、GSIS がほぼ保たれていた 100 μM トルブタミド処理群で発現が変化した遺伝子群とを比較した。前者に含まれ後者に含まれない (すなわち 10 μM グリベンクラミド処理群でのみ発現が変化したもの) 遺伝子を 6 種選定した (Group1)。これらは、SU 剤による GSIS 障害に関連がある可能性があり、二次無効に関与する分子の有望なリストである。またその逆に、100 μM トルブタミド処理群で発現が変化した、10 μM

グリベンクラミド処理群で変化しなかった遺伝子を 5 種選定した (Group2)。これらは、SU 剤による GSIS 障害に防御的にはたらく可能性、あるいは GSIS に有利にはたらく可能性も期待された。

b) SU 剤反応性遺伝子のインスリン分泌における関与の実証

### b-1) siRNA を用いた発現抑制

まず、siRNA 投与 24 時間後に回収した RNA を用いてリアルタイム RT-PCR 法 (TaqMan 法) を行い、それぞれのノックダウン効率を検証した。各遺伝子とも siRNA を 3 種デザインしたが、種々の条件検討を行い、コントロール siRNA 処理細胞と比較して、おおよそ 50% 程度の発現抑制が得られた。

b-2) 発現抑制によるインスリン分泌への効果

Group1 遺伝子群のうち、グリベンクラミド処理群で発現が増加していた 5 遺伝子については、10 μM グリベンクラミド処理による GSIS 障害モデルにおいて、あらかじめ遺伝子をノックダウンしておくことで、表現型をレスキューできるかどうか (すなわち GSIS を保てるかどうか) を検討した。ネガティブコントロール siRNA 投与では、10 μM グリベンクラミド処理により高グルコース刺激 (25mM Glucose) によるインスリン分泌の低下 (GSIS 障害モデル) に影響は見られなかった。一方、5 遺伝子のうち 3 遺伝子については、複数の siRNA にて、高グルコース刺激によるインスリン分泌が改善していた。このうち、Prss23、Zfp3612 のノックダウンでは、低グルコース (3mM Glucose) 刺激での分泌も上昇しており、いわゆる「グルコース反応

性」が改善している証拠は必ずしも得られなかったが、Rps6ka のノックダウンでは、いわゆる GSIS も改善していた。また、3 遺伝子のいずれにおいても、高 K (30mM KCl) 刺激による分泌は増加していた。

Group1 遺伝子群のうち、グリベンクラミド処理群で発現が低下していた 1 遺伝子および Group2 の遺伝子のうち、トルブタミド処理群で発現が増加していた 4 遺伝子については、通常培地における遺伝子ノックダウンの効果を検討したが、いずれの発現抑制においても、ネガティブコントロール siRNA 処理細胞と比較して、GSIS、high K 刺激による分泌のいずれも有意な変化はみられなかった。100  $\mu$ M トルブタミド処理群で発現が低下していた 1 遺伝子については、発現低下によりグリベンクラミド処理時の GSIS 障害を改善 (レスキュー) できる可能性を考え、ノックダウンしたのちに 10  $\mu$ M グリベンクラミドで 16 時間処理してインスリン分泌を測定した。しかしネガティブコントロール siRNA 投与細胞と同様であり、GSIS 障害をレスキューすることはできなかった。

## 2) 患者検体の解析

### a) SU 剤二次無効との相関解析のための臨床パネルの作製

遺伝子解析の同意を得た糖尿病患者 800 人のうち、1 型糖尿病や他疾患による 2 次性糖尿病が否定され、薬剤内服歴を確認することのできた約 600 人について、まずゲノム収量の少なかった例を除き、次に該当する者を抽出した。結果として、二次無効群 83 名、長期有効群 (対象群) 290 名、早期無効群 16 名の臨床パネルが作製された。患者背景因子としては、BMI (Body mass index) あるいは既往最大 BMI はほぼ変わら

ず、「二次無効群」で必ずしもやせ型が多いわけではなかった。発症年齢もほぼ同等であった。糖尿病性神経症、網膜症及び前増殖性以上の網膜症、はいずれも二次無効群、次いで早期無効群で若干高い傾向にある。一方で、腎症、虚血性心疾患はむしろ早期無効群で高く、また脳血管障害は差がなかった。

### b) ゲノム網羅的遺伝子多型解析

SU 剤長期有効患者 140 名、二次無効患者 71 名につき、実験を終了した。DM アルゴリズムによる平均アレル判定率は 94.72% であり、BRLMM アルゴリズムによる平均アレル判定率は 98.39% であった。なお、SU 剤長期有効患者及び二次無効患者の平均 SU 剤使用期間は、それぞれ  $15.0 \pm 6.7$  年、 $11.2 \pm 7.3$  年であった。

Nsp Array に含まれる 262,264 種の一塩基多型のうち、3 種のフィルタリング条件を全て満たした多型は 176,826 種であり、全多型総数の 67.4% であった。これらの多型は全ての染色体に均等に分布していた。

各種の統計モデルにより SU 剤長期有効患者群と二次無効患者群間で相関解析を行った。コクラン・アーミテージ検定で  $p < 0.001$  を示した遺伝子多型のうち、対立遺伝子モデル、共有性モデル、優性モデル、劣性モデルのいずれかに対するカイ二乗検定 (または Fisher の正確確率検定) においても  $p < 0.001$  を示した多型数は 100 種であった。低い p 値を示した多型の中には、アポトーシス関連のシグナル伝達分子、脂質代謝に関与する分子、蛋白質分解酵素等をコードする遺伝子の領域内または、その近傍に位置する多型が含まれていた。また、上記 4 つのモデルのいずれかに対するカイ二乗検定 (または Fisher の正確確率検定)

または、コ克蘭・アーミテージ検定において  $p < 0.001$  及び  $p < 0.01$  を示した多型の数は、それぞれ 267 種及び 3005 種であった。

各モデルで得られた検定結果の  $p$  値に対して log Quantile - Quantile (QQ)  $p$ -value plot を作製し、多重比較法による検討を行った。低い  $p$  値を示した上位 4 種の多型において、それらの  $p$  値が、観測値の一様分布から外れて期待値よりも小さい値を示したことから、二次無効との関連性が強く示唆された。これらのうち、2 種は 7 番及び 12 番染色体の遺伝子のない領域に属していたが、残り 2 種は、共に 9 番染色体に位置し、それぞれ RNA のプロセッシングに関与する因子及び転写制御因子をコードする遺伝子の近傍に位置していた。

### c) 候補遺伝子多型解析

#### c-1) シーケンシングによる遺伝子多型同定

*HNF4A* : 膵β細胞機能に関与する。まずエクソン部分につき解析し、16 種の新規を含む 39 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは新規の 2 種を含む 3 種類であった。3 ブロックに分割し、ハプロタイプ解析を行った。ブロック 1 では 10 種類を、ブロック 2 では 16 種類を、ブロック 3 では 12 種類を、それぞれ推定した。さらに頻度約 3%以上のハプロタイプを同定するためのタグ多型も選定した。

*TNFAIP3* : アポトーシス耐性に関わる遺伝子である。12 種の新規を含む 18 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは新規の 3 種を含む 4 種類であった。1 ブロックとしてハプロタイプを解析し、13 種のハプロタイプを推定した。さらに頻度約 3%以上の 5 種のハプロタイプを同定するためのタグ多型 4 種及びアミノ酸置換を伴うハプロタイプ 3 種を検出するためのタグ

多型 3 種を選定した。

*IPF1* : インスリンの発現に関与する。6 種の新規を含む 10 多型を同定した。1 ブロックとしてハプロタイプを解析し、8 種のハプロタイプを推定した。さらに頻度約 3%以上の 4 種のハプロタイプを同定するためのタグ多型 3 種を選定した。

*HMOX1* : 酸化ストレス耐性に関わる遺伝子である。9 種の新規を含む 15 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは既知の 1 種類であった。1 ブロックとしてハプロタイプを解析し、19 種のハプロタイプを推定した。さらに頻度約 3%以上の 5 種のハプロタイプを同定するためのタグ多型 5 種を選定した。

*TXNIP* : 膵β細胞にて高グルコース刺激で発現レベルが上昇し、アポトーシスを誘導することが知られている。酸化ストレス耐性を与えるチオレドキシシンと相互作用し、その活性を押さえる働きをする。本遺伝子では、16 種の新規を含む 21 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは 4 種であり、すべて新規であった。1 ブロックとしてハプロタイプを解析し、18 種のハプロタイプが推定された。このうち頻度約 1%以上のものは 7 種であった。

*GLRX* : コードするグルタレドキシシンは、上記チオレドキシシンと並ぶ重要な酸化ストレス蛋白である。本遺伝子では、3 種の新規を含む 8 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは含まれていなかった。1 ブロックとしてハプロタイプを解析し、11 種のハプロタイプが推定された。このうち頻度約 1%以上のものは 7 種であった。

#### c-2) タイピング系の開発

*TNFAIP3*, *LAPP*, *HMOX1*, *IPF1*, *GCLM*, 等

のハプロタイプ多型等、計 38 種につき、開発したパイロシーケンシング法によるタイピングを試みたところ、解析した全ての多型及び検体につき明瞭なタイピング結果が得られた。また本結果は、直接シーケンス法による結果と完全に一致した。

### c-3) 二次無効と候補遺伝子多型との相関解析

シーケンシング、タイピングにて解析した約 40 遺伝子 115 多型について、長期有効群 278 名及び二次無効群 80 名の間で、多型頻度及びハプロタイプ頻度を比較し、3 種の遺伝子の多型が有意な頻度差を示した。一方、SU 剤有効 11 年以上の長期有効群 130 名及び SU 剤使用 10 年以内でインスリン治療に移行した二次無効群 42 名という、フェノタイプの差が大きいサブグループ間で比較したところ、6 遺伝子 11 多型に関し、ゲノタイプモデルやアレルモデルで有意な差が認められた ( $p=0.045\sim 0.00009$ )。これら 11 多型及び患者背景因子を説明変数として多変量解析を行ったところ、4 種の多型が二次無効発現の有意な説明変数となり、二次無効予測モデルを確立した。SU 剤の開始年齢等の患者背景因子は有意な変数として残らなかった。

## D. 考察

### I 一次無効関連

グリメピリドの一次無効（薬効）との相関を検討するための遺伝子多型解析は、薬物代謝酵素、薬物トランスポーター及び薬物受容体の 8 遺伝子につき、対象患者検体の多型解析を行い、引き続き相関解析を行った。単相関解析で有意となった 3 種の遺伝子のハプロタイプは、1 種を除き機能変

化が *in vitro* で明確に示されておらず、新規性の高いものであった。一方、多変量解析の結果、遺伝子型及び患者背景因子を説明変数として含む薬効予測モデルを確立した。今後も「投与開始 4 ヶ月後の HbA<sub>1c</sub> 値」等を応答変数として用いるなど、さらなる相関解析を行う予定である。なお低血糖等の副作用に関しては、例数が少なく統計的な解析はできなかった。

また一次無効（及び二次無効）との相関解析の際の重要な参考データとするため、4 種の遺伝子（CYP2C9, CYP2C19, CYP2C8, HNF4A）に関し、新たに見出されたアミノ酸置換を伴う計 12 種類の多型の *in vitro* 機能解析を行い、機能影響を明らかとした。

CYP2C9 では、解析した 7 種の新規多型のうち 1 種で活性の消失が、また 3 種で活性の低下が認められた。活性が消失した Lys118ArgfsX9 は基質やヘムの結合領域を含む 75%を失うものであった。Km 値が上昇した Ala477Thr では基質との相互作用が変化した可能性が考えられた。また Vmax 値のみ変化した Thr130Arg では、酵素活性に必要な NADPH-P450 還元酵素やシトクロム b5 との会合に影響を与えることにより酵素活性の低下を招いている可能性が考えられた。活性低下を伴う Ile359Leu を有する患者を含め、これら活性低下を示す多型を有している場合、グリメピリドの効果が十分に得られる傾向にあり、これらの多型による代謝能低下・薬物血中濃度上昇の可能性が考えられた。

CYP2C19 では還元型 CO 差スペクトル測定の結果、CYP 含量（ホロ蛋白質レベル）は、CYP2C19.18>CYP2C19.1B>CYP2C19.19 の順であり、酵素間で大きく異なっていた。この原因は不明であるが、酵素蛋白質の転写/翻訳効率の変化、あるいは発現蛋白

質の折りたたみ効率や安定性の変化等の可能性が考えられる。また酵素活性の測定では、Ser51Gly 置換を伴う CYP2C19.19 の *S*-メフェニトイン 4'-水酸化反応の  $K_m$  値は野生型 CYP2C19 に比べ有意に高く、ミクロソーム蛋白質量及び CYP 含量当たりの  $V_{max}/K_m$  値は有意に低かった。従って、Ser51Gly 置換は *S*-メフェニトインに対する親和性を低下させ、その代謝能も低下させることが示唆された。Ser51Gly 置換はオメプラゾールに対しても親和性を低下させるが、その程度は小さく、 $V_{max}/K_m$  値に有意な変化は見られなかった。これらの結果から、CYP2C19\*19 のアミノ酸置換による酵素機能変化は基質によって異なることが推察された。

また、CYP2C8 では、CYP2C8.Y に関して、ホロ+アが酵素の発現は野生型と同程度であったものの、ホロ酵素の発現は認められず、またパクリタキセル 6 $\alpha$ -水酸化活性も全く有していなかった。これはホロ酵素発現のなさを概ね反映したものと思われ、CYP2C8.Y が有するアミノ酸置換は、酵母細胞での酵素蛋白発現過程における蛋白質の折りたたみやその構造安定性に影響を与えている可能性が考えられる。また、CYP2C8.Y におけるアミノ酸置換部位はパクリタキセルに対する代謝能を規定する重要なアミノ酸残基であることが示唆された。一方、CYP2C8.X でもホロ酵素の発現レベルが野生型の約 40%に低下していたものの、P450 蛋白質当たりのパクリタキセル 6 $\alpha$ -水酸化活性は野生型と同程度であった。本ホロ酵素の発現レベルの低下が、哺乳動物細胞でも見られるか否かは今後の検討課題である。

一方、HNF4A では野生型と変異型の間で、1型及び2型の HNF4 $\alpha$ いずれにおいて

も転写活性に有意な差は認められず、2つの連鎖する一塩基多型 1154C>T (A385V) 及び 1193T>C (M398T)は、転写活性に顕著な影響を与えないことが示唆された。

## II 二次無効関連

二次無効の発現機構としては、SU 剤による膵  $\beta$  細胞の機能障害及び細胞死（アポトーシス）が一因として考えられている。例えば、持続的な  $\beta$  細胞の興奮（特に、持続的な細胞内 Ca 濃度上昇）による  $\beta$  細胞死、SU 剤による強制的な分泌刺激による小胞体（ER）ストレスや、酸化ストレスの関与も考えられている。最終的には  $\beta$  細胞数の減少を伴う不可逆な現象と思われるが、比較的初期に生じている現象が明らかになれば、介入の標的となる可能性が考えられる。一方で、SU 剤の中でも二次無効を起こしやすいものと、起こしにくいものがあるとされ、特に作用が強力かつ持続時間の長いグリベンクラミドは二次無効を生じやすく、作用時間の比較的短いトルブタミド、あるいは抗酸化作用をもつグリクラジドは、比較的二次無効を生じにくいといわれる。

今回用いた SU 剤障害 *in vitro* モデル系では、細胞数の明らかな減少は認めず、機能障害（インスリン分泌障害）のみ認められること、GSIS の低下が見られるが高 K 刺激によるインスリン分泌は比較的保たれていること、機能障害が二次無効を生じやすいグリベンクラミドでみられトルブタミドでみられなかったこと、などから、二次無効のきわめて初期に生じている現象を反映する、非常に有用なモデルが作成できたと思われる。網羅的発現解析から得られた遺伝子について、興味深い変動をするものを選び、機能的意義を解析した。このうち、Group1（グリベンクラミド処理でのみ発現

が変化していた遺伝子)は、GSIS 障害に直接関与している可能性が考えられた。興味深いことに、グリベンクラミド処理で発現増加していた 5 遺伝子のうち、Rps6ka2、Prss23、Zfp3612 の 3 種については、あらかじめ siRNA でノックダウンしておいた後にグリベンクラミドで処理すると、高グルコース刺激でのインスリン分泌が改善された。したがって、これらの遺伝子はインスリン分泌と関係するだけでなく、SU 剤による膵β細胞障害を防ぐ、治療介入の標的となりうる可能性もある。Rps6ka2 及び Zfp3612 は、細胞の増殖に関係すると考えられ、膵β細胞の増殖や生存に重要な意義を持つ可能性がある。これらの遺伝子は、二次無効の候補遺伝子としての解析も期待され、今後さらに研究を進めてゆきたい。

患者検体の解析では、二次無効の発現機構が不明なため、ゲノム網羅的遺伝子多型解析を行った。本解析においては、多量な遺伝子多型データを扱うため、その品質管理が不可欠である。解析多型の抽出条件として、各 Chip のアレル判定率を 93%以上とし、多型ごとのアレル判定率を 90%以上、マイナーアレル頻度を 5%以上に設定し、さらに HWE 法則への適合度検定を行った。これらにより、タイピングの正確性及び遺伝継承法則への適合性は、十分に保証されていると考える。今回、SU 剤長期有効患者 140 名、二次無効患者 71 名における相関解析から、100 種の多型が  $p < 0.001$  で二次無効と相関した。これらの中には、アポトーシス関連のシグナル伝達分子、脂質代謝に関与する分子、蛋白質分解酵素等をコードする遺伝子の領域内または、その近傍に位置する多型等が含まれていた。しかしながら、タイプ I の誤りの多重性を考慮すると、現時点で、これらの多型が二次無効に関与す

ると判断することはできない。また、log QQ  $p$ -value plot における多重比較法において有意であった 4 個の多型の検出力は、0.55 - 0.65 であり比較的高いものであったが、十分ではなかった。

一方、候補遺伝子としては、合計で約 40 遺伝子 115 多型の解析を行った。相関解析は、主として、SU 剤有効 11 年以上の長期有効群 130 名及び SU 剤使用 10 年以内でインスリン治療に移行した二次無効群 42 名というフェノタイプが大きく異なるサブグループ間でアレル頻度等を比較した。その結果、6 種の遺伝子の 11 多型が有意な頻度差を示した。これらの遺伝子は、膵β細胞におけるインスリン分泌能及びその維持等に重要な遺伝子であり、二次無効発現との相関は合理的に説明可能である。また多型を含めた多変量解析では、患者背景因子が有意な変数とならず、4 種の遺伝子多型のみが有意となった。このことから本予測系を用いれば、患者背景因子に左右されず遺伝子多型結果のみで、二次無効発現をある程度事前予測しうると考えられる。従って、本系は二次無効回避を目的として、各患者に適した医薬品を選択する際に、非常に有用と考えられる。本系で二次無効発現が予測された場合には、他の薬物治療やインスリン治療に移行するなどの対策を早期に取ることにより、合併症の減少や患者の QOL 改善につながると期待される。

今後は、ゲノム網羅的解析で関与が示唆された遺伝子多型の二次スクリーニングを行い、有用多型を更に同定し、二次無効予測法の精度を上げることに全力を尽くす。

## E. 結論

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬、特にスルホニルウレア剤 (SU 剤) につき、患

者毎の遺伝子型に基づく投薬法（投薬量及び薬物選択法）を確立することを目指して研究を進めた。

一次無効との相関解析関連では、第3世代のSU剤グリメピリドを投与された検体134例を対象に、その体内代謝・動態・作用点関連8遺伝子の多型解析において約500多型を見だし、さらにハプロタイプ解析によりタグ多型を同定した。また代謝に関連するCYP2C9やCYP2C19等の4遺伝子の新規同定多型12種につき、*in vitro*機能解析を行い、6多型が活性低下を示すことを明らかにし、本情報を患者検体との相関解析に用いた。最終的に、解析した8遺伝子のハプロタイプ中3種が単相関解析でグリメピリドの有効性（HbA<sub>1c</sub>値の減少率）と有意に相関し、さらに多変量解析により、このうちの2ハプロタイプと4種の患者背景因子が有意な説明変数となり、一次無効（薬効）予測モデルを確立した。

二次無効との相関解析関連では、二次無効の発現機構が不明であるため、*in vitro*で確立したSU剤によるインスリン分泌障害モデルを用い、二次無効を起こしやすいSU剤と起こしにくいSU剤により誘導が異なる遺伝子をDNAチップで検索し、さらに実際のインスリン分泌への影響を遺伝子発現ノックダウンにより実証し、3種の遺伝子がSU剤によるインスリン分泌障害に関与することを示唆する結果を得た。二次無効群、長期有効群（対照群）、早期無効群の検体（計389例）を用いた相関解析では、ゲノム網羅的遺伝子多型解析を、SU剤長期有効患者140名、二次無効患者71名に関して行った結果、100種の多型が $p < 0.001$ で二次無効と相関した。これらの中には、アポトーシス関連のシグナル伝達分子、脂質代謝に関与する分子、蛋白質分解酵素等をコ

ードする遺伝子の領域内または、その近傍に位置する多型が含まれていた。またlog Quantile-Quantile p-value plotによる多重比較法において4種の多型が二次無効発現と有意に相関した。また候補遺伝子多型解析では、主として、SU剤有効11年以上の長期有効患者130名及びSU剤使用10年以内でインスリン治療に移行した二次無効患者42名というフェノタイプが大きく異なるサブグループ間で、約40遺伝子115多型のアリル頻度等を比較し、単相関解析で11種の有意に異なる多型を見いだした。さらに本研究で相関が明らかとなった多型を用いて多変量解析を行い、4種の遺伝子多型が説明因子となる二次無効予測モデルを確立した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, K. Maekawa, S. Ozawa, R. Hasegawa, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Suzuki, T. Yanagawa, M. Tohkin, and J. Sawada: Genetic variations and haplotypes of *CYP2C19* in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 20, 300-307, 2005.
- 2) S. Ikeda, K. Kurose, H. Jinno, K. Sai, S. Ozawa, R. Hasegawa, K. Komamura, T. Kotake, H. Morishita, S. Kamakura, M. Kitakaze, H. Tomoike, T. Tamura, N. Yamamoto, H. Kunitoh, Y. Yamada, Y. Ohe, Y. Shimada, K. Shirao, K. Kubota, H. Minami, A. Ohtsu, T. Yoshida, N. Saijo, Y. Saito and J. Sawada: Functional analysis of four naturally occurring variants of human constitutive androstane receptor. *Mol. Genet. Metab.*, 86, 314-319, 2005.

- 3) T. Isobe, H. Hichiya, N. Hanioka, S. Yamamoto, et al.: Different effects of desipramine on bufuralol 1"-hydroxylation by rat and human CYP2D enzymes. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 634-640, 2005.
- 4) S. Narimatsu, N. Takatsu, S. Yamano, Y. Inoue, N. Hanioka, et al.: The effect of dimethyl sulfoxide on the function of cytochrome P450 2D6 in HepG2 cells upon the co-expression with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Chem. Biol. Interact.*, 159, 47-57, 2006.
- 5) K. Maekawa, H. Fukushima-Uesaka, M. Tohkin, R. Hasegawa, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Suzuki, T. Yanagawa, Y. Saito and J. Sawada: Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of CYP2C9 in Japanese. *Pharmacogenet. Genomics*, 16, 497-514, 2006.
- 6) K. Sai, M. Itoda, Y. Saito, K. Kurose, N. Katori, N. Kaniwa, et al. : Genetic variations and haplotype structures of the ABCB1 gene in a Japanese population: an expanded haplotype block covering the distal promoter region, and associated ethnic differences. *Ann. Hum. Genet.*, 70, 605-622, 2006.
- 7) K. Maekawa, M. Itoda, K. Sai, Y. Saito, N. Kaniwa, K. Shirao, T. et al. : Genetic variations and haplotype structure of the ABC transporter gene ABCG2 in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 21, 109-121, 2006.
- 8) S. Narimatsu, R. Yonemoto, K. Saito, K. Takaya, T. Kumamoto, T. Ishikawa, ..., and N. Hanioka: Oxidative metabolism of 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (Foxy) by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1377-1385, 2006.
- 9) S. Narimatsu, F. Torigoe, Y. Tsuneto, K. Saito, N. Hanioka, et al.: Cloning of a cDNA encoding a novel marmoset CYP2C enzyme, expression in yeast cells and characterization of its enzymatic functions. *Biochem. Pharmacol.*, 72, 1738-1748, 2006.
- 10) H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, K. Maekawa, M. Saeki, N. Kamatani, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda and J. Sawada: Novel genetic variations and haplotypes of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4A) found in Japanese type II diabetic patients. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 21, 337-346, 2006.
- 11) H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, M. Tohkin, K. Maekawa, R. Hasegawa, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Suzuki, T. Yanagawa, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda and J. Sawada: Genetic variations and haplotype structures of the ABC transporter gene ABCC1 in a Japanese population. *Drug Metab. pharmacokinet.*, 22, 48-60, 2007.
- 12) Y. Saito, K. Maekawa, S. Ozawa and J. Sawada: Genetic polymorphisms and haplotypes of major drug metabolizing enzymes in East Asians and their comparison with other ethnic populations. *Curr. Pharmacogenomics*, 5, 49-78, 2007.
- 13) N. Hanioka, Y. Tsuneto, Y. Saito, T. Sumada, K. Maekawa, K. Saito, J. Sawada, S. Narimatsu.: Functional characterization of two novel CYP2C19 variants (CYP2C19\*18 and CYP2C19\*19) found in a Japanese population. *Xenobiotica*, 37:342-355, 2007.
- 14) H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, K. Maekawa, R. Hasegawa, K. Suzuki, T. Yanagawa, H. Kajio, N. Kuzuya, M. Noda, K. Yasuda, M. Tohkin, J. Sawada.: Genetic variations of the ABC transporter gene