

200707017A

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

# オーダーメイド薬物療法のための革新的な ベッドサイド遺伝子診断法の開発と応用

平成19年度 総括研究報告書  
主任研究者 松原 洋一

平成20年（2008）3月

## 目 次

I. 総括研究報告	
オーダーメイド薬物療法のための革新的なベッドサイド遺伝子 診断法の開発と応用	1
松原 洋一	
II. 分担研究報告	
1. CASSOH 法の臨床応用へ向けての検討	7
松原 洋一	
2. CASSOH 法に用いる唾液検体の採取器具の検討	11
呉 繁夫	
3. 薬物代謝酵素遺伝子多型の酵素活性に与える影響	16
水柿 道直	
4. 日本人集団における有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報 の収集	19
平塚 真弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
IV. 研究成果の刊行物・別刷	25

# I . 総括研究報告

総括研究報告書

オーダーメイド薬物療法のための革新的なベッドサイド遺伝子診断法の開発と応用

主任研究者 松原 洋一（東北大学大学院・教授）

研究要旨：

本研究の目的は、主任研究者らが先に開発したイムノクロマトグラフィー試験紙を用いる遺伝子診断法（CASSOH法）を応用し、一般医療機関レベルで薬理遺伝学的遺伝子多型を簡便・迅速に検出できる革新的なベッドサイド遺伝子診断法を確立することにある。今年度は、CASSOH法の前臨床試験と臨床応用へ向けての検討、唾液検体の採取器具の開発、薬物代謝酵素遺伝子多型の酵素活性に与える影響の検討、日本人集団における有用な薬理遺伝学的遺伝子多型情報の収集をおこなった。これによって、臨床応用への基盤を整備した。本研究で確立された遺伝子診断法を普及させることにより、一般医療機関におけるオーダーメイド薬物療法を飛躍的に推進することが期待される。

分担研究者

呉 繁夫	東北大学大学院・助教授
水柿 道直	東北薬科大学・教授
平塚 真弘	東北薬科大学・講師
佐々木 崇光	東北薬科大学・助手

本研究の目的は、主任研究者らが独自に開発した革新的な遺伝子診断法を用いることによって、一般医療機関において薬理的遺伝子多型を簡便・迅速に検出できる検査法を確立し、個別化薬物療法が実施できる体制を確立することにある。

A. 研究目的

ゲノム研究の進展に伴い、薬物動態、薬効、副作用発現等の個人差が薬物代謝酵素や薬物標的分子等の遺伝子多型に起因することが次々と明らかになってきた。このようなファーマコジェネティクスに基づく個別化薬物療法は、その臨床的な重要性が唱えられて久しいが、いまだに一般の医療機関に導入されていない。その大きな理由の一つとして、従来の遺伝子診断には特殊な機器や専門的な技術が必要であり、これらを一般病院で実施することが困難ということが挙げられる。オーダーメイド医療の普及には、新たな視点に立つ遺伝子検査法の実用化が必要である。

B. 研究方法

① CASSOH法の前臨床試験と臨床応用へ向けての検討（松原洋一）

前臨床試験の対象となる薬理的遺伝子多型の選定、インフォームド・コンセントおよび遺伝カウンセリングについての検討、さらに安全性・非侵襲性の検討をおこなった。

②CASSOH法に用いる唾液検体の採取器具の検討（呉繁夫）

唾液検体の採取法、唾液吸収素材の検討、唾液処理法について検討をおこなった。

③薬物代謝酵素遺伝子多型の酵素活性に与える影響の検討（水柿道直）

キサントキナーゼ(XO)の21種類の遺伝子多型を導入したXOバリエーション酵素を、それぞれCOS-7細胞に発現させ、これらの発現タンパクを用いて酵素活性を測定した。

④日本人集団における有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報の収集(平塚真弘)

日本人由来のDNA 200検体について、CYP2J2のプロモーター(-3246~+45)とCYP2J2、CYP2S1及びCYP2W1の各エクソン(各9箇所)についてSNPスクリーニングとハプロタイプ解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、直接ヒトを対象とした研究を行うものではなく、また遺伝子解析そのものを目的とする研究でもない。標準検体および変異・多型を有するDNAを遺伝子検査法の検定に用いることについては、東北大学医学部倫理委員会の審査を受け、承認された(承認番号 2003-105)。

### C. 研究結果

① CASSOH法の前臨床試験と臨床応用へ向けての検討(松原洋一)

前臨床試験の対象となる薬理的遺伝子多型の選定をおこなうとともに、個別化薬物療法のための遺伝子診断を一般病院で普及させるために必要な、新しい遺伝カウンセリングのあり方についての検討および安全性・非侵襲性の検討をおこなった。

②CASSOH法に用いる唾液検体の採取器具の検討(呉繁夫)

市販の唾液採取器具の比較検討、吸収素材(ろ紙、セルロース、PVAスポンジ)の比較、唾液処理を用いたPCR増幅とCASSOHの検討をおこなった。その結果を踏まえて、唾液を簡便かつ定量的に採取する器具を開発することができた。

③薬物代謝酵素遺伝子多型の酵素活性に与える影響の検討(水柿道直)

21種類全ての変異型XOの哺乳類細胞発現用クローンを構築し、変異型XOを発現させる

ことができた。その発現量は、野生型XOと比較しAsn909Lys、Thr910Lys及びPro1150Arg型の変異型において有意な低下が認められ、これらのSNPの存在によるXOの安定性の低下が示唆された。また、発現タンパク質の酵素速度論的解析をあわせて行った。

④日本人集団における有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報の収集(平塚真弘)

CYP2J2遺伝子のプロモーターにおいて2種の新規SNP(-2104A>G、-587G>A)を、CYP2S1遺伝子に、新規アミノ酸置換を伴うSNPである5479T>G(Leu230Arg)と、アミノ酸置換を伴わない新規サイレントSNPとして4612G>A(Glu147Glu)及び5478C>T(Leu230Leu)を同定した。CYP2W1遺伝子に、アミノ酸置換を伴う新規SNPとしてCYP2W1のエクソン1(173A>C; Glu58Ala)に1種及びエクソン9(5432G>A; Val432Ile、5584G>C; Gln482His)に2種検出した。さらにハプロタイプ解析を行い、CYP2W1\*1B~\*6のアレルを同定し、日本人におけるCYP2W1遺伝子が7種類のハプロタイプを含んでいることを明らかにした。日本人におけるCYP2W1遺伝子は、白人に比べて変異型を有する割合の方が高いことが明らかになった。

### D. 考察

本研究の最終年度として、当初の研究計画を達成するとともに、さらに発展させた研究を行なうことができた。

CASSOH関連技術としては、唾液を簡便かつ定量的に採取する器具の開発を行った。昨年度に開発した唾液処理液と合わせて利用することにより、CASSOH法による遺伝子検査のさらなる迅速化を達成することができた。これまでに例を見ない、迅速・簡便・安価な遺伝子検査法の開発に成功したこと(図1)により、本研究の成果が日経産業新聞の1面トップ記事に取り上げられるなど、社会的にも大きな注目を浴びた(図2)。

6-MPの肝臓での主要代謝酵素であるキサ

ンチンオキシダーゼ遺伝子多型の機能解析では、酵素活性が変化するXO遺伝子多型の存在を明らかにした。本研究で得られた情報が、これまで未解明であった6-MPによる肝機能障害の発症に関与する因子である可能性が示唆された。

CYP2J2、CYP2S1及びCYP2W1の遺伝子上に同定された新規SNPおよびCYP2W1の多様なバリエーションについては、今後の機能解析と表現型との関連が期待される。

さらに、前臨床試験と臨床応用へ向けての検討では、今後、薬理遺伝学的検査の前臨床試験を実施するにあたり、個別化薬物療法のための遺伝子診断にともなう遺伝カウンセリングについての新しい方向性について示唆された。

## E. 結論

今年度の研究によって、当初の研究計画がほぼ達成された。今後、CASSOH法を一般医療機関に普及させることにより、ベッドサイド遺伝子診断による個別化薬物療法の実用化が可能と考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hanzawa Y, Sasaki T, Hiratsuka M, Ishikawa M, Mizugaki M. Three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of CYP2S1 gene in Japanese individuals. *Drug Metabol. Pharmacokin.*; 22, 136-140, 2007
- 2) Oda M, Kure S, Sugawara T, Yamaguchi S, Kojima K, Shinka T, Sato K, Narisawa A, Aoki Y, Matsubara Y, Omae T, Mizoi K, Kinouchi H. Direct correlation between ischemic injury and extracellular glycine concentration in mice with genetically altered activities of the glycine cleavage multienzyme system. *Stroke* 38:2157-64, 2007.
- 3) Kanno J, Kure S, Narisawa A, Kamada F, Takayanagi M, Yamamoto K, Hoshino H, Goto T, Takahashi T, Haginoya K, Tsuchiya S,

Baumeister FA, Hasegawa Y, Aoki Y, Yamaguchi S, Matsubara Y. Allelic and non-allelic heterogeneities in pyridoxine dependent seizures revealed by ALDH7A1 mutational analysis. *Mol Genet Metab* 91:384-9, 2007

4) Makita Y, Narumi Y, Yoshida M, Niihori T, Kure S, Fujieda K, Matsubara Y, Aoki Y. Leukemia in Cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: a patient with a germline mutation in BRAF proto-oncogene. *J Pediatr Hematol Oncol* 29:287-90, 2007

5) Kanno J, Hutchin T, Kamada F, Narisawa A, Aoki Y, Matsubara Y, Kure S. Genomic deletion within GLDC is a major cause of non-ketotic hyperglycinaemia. *J Med Genet* 44:e69, 2007.

6) Nava C, Hanna N, Michot C, Pereira S, Pouvreau N, Niihori T, Aoki Y, Matsubara Y, Arveiler B, Lacombe D, Pasmant E, Parfait B, Baumann C, Héron D, Sigaudy S, Toutain A, Rio M, Goldenberg A, Leheup B, Verloes A, Cavé H. Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype-phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J Med Genet.* 44:763-71, 2007.

7) Narumi Y, Aoki Y, Niihori T, Neri G, Cave H, Verloes A, Nava C, Kavamura MI, Okamoto N, Kurosawa K, Hennekam RC, Wilson LC, Gillesen-Kaesbach G, Wiczorek D, Lapunzina P, Ohashi H, Makita Y, Kondo I, Tsuchiya S, Ito E, Sameshima K, Kato K, Kure S, Matsubara Y. Molecular and clinical characterization of cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: overlapping clinical manifestations with Costello syndrome. *Am J Med Genet A* 143:799-807, 2007.

9) Kudo M, Moteki T, Sasaki T, Konno Y, Ujiiie S, Onose A, Mizugaki M, Ishikawa M,

Hiratsuka M. Functional characterization of human xanthine oxidase allelic variants. *Pharmacogenet. Genom.*, 18, 243-251, 2008.

10) Sakamoto O, Ohura T, Matsubara Y, Takayanagi M, Tsuchiya S. Mutation and haplotype analyses of the MUT gene in Japanese patients with methylmalonic acidemia. *J Hum Genet.* 52:48-55, 2007.

11) Hanzawa Y, Sasaki T, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. Genetic polymorphisms and haplotype structures of the human CYP2W1 gene in a Japanese population. *Drug Metab. Dispos.*, 36, 349-352, 2008.

12) 松原洋一：存亡の危機に瀕する稀少遺伝性疾患の遺伝子検査、医学のあゆみ（印刷中）

## 2. 学会発表

1) Kure S, Hiratsuka M, Ebisawa A, Kamada F, Komatsuzaki S, Kanno J, Narisawa A, Aoki Y, Mizugaki M, Matsubara Y. Competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) method: Applications to genotyping of clinically important SNPs in pharmacogenetics. 57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, October 23-27, 2007.

2) Hiratsuka M, Hanzawa Y, Sasaki T, Sakuyama K, Ishikawa M, Mizugaki M, Karlgren M, Tachibana M, Gomez A,

Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms and haplotype structures of the CYP2W1 gene in a Japanese population, 8th International ISSX Meeting, Sendai, Japan, October 9-12, 2007

3) 呉 繁夫、鎌田文顕、菅野潤子、鳴海洋子、新堀哲也、青木洋子、松原洋一、小児科外来・ベッドサイドで実施可能な迅速・簡便な遺伝子診断法の開発と応用、第110回日本小児科学会学術集会、京都、平成19年4月

4) 菅野潤子、呉 繁夫、鎌田文顕、山本克哉、高橋孝雄、萩野谷和也、土屋滋、青木洋子、松原洋一、ピリドキシン依存性けいれん：ALDH7A1変異解析で見出された遺伝的背景の異質性、第110回日本小児科学会学術集会、京都、2007年4月

5) 呉 繁夫、グリシン脳症（非ケトーシス型高グリシン血症）の新しい酵素診断法と遺伝子診断法の開発、第49回日本小児神経学会総会、大阪、2007年7月

## G. 知的所有権の取得状況

本研究の基本技術である CASSOH 法の特許出願状況は以下の通り。

出願番号： 2002-323419

発明者： 松原洋一、呉 繁夫

発明の名称： 遺伝子変異検出法

出願人： 松原洋一、呉 繁夫

出願日： 平成14年11月7日

(国際特許出願済：PCT/JP2003/0142)

図1. 本研究によって実現可能となったベッドサイド遺伝子診断による個別化薬物療法

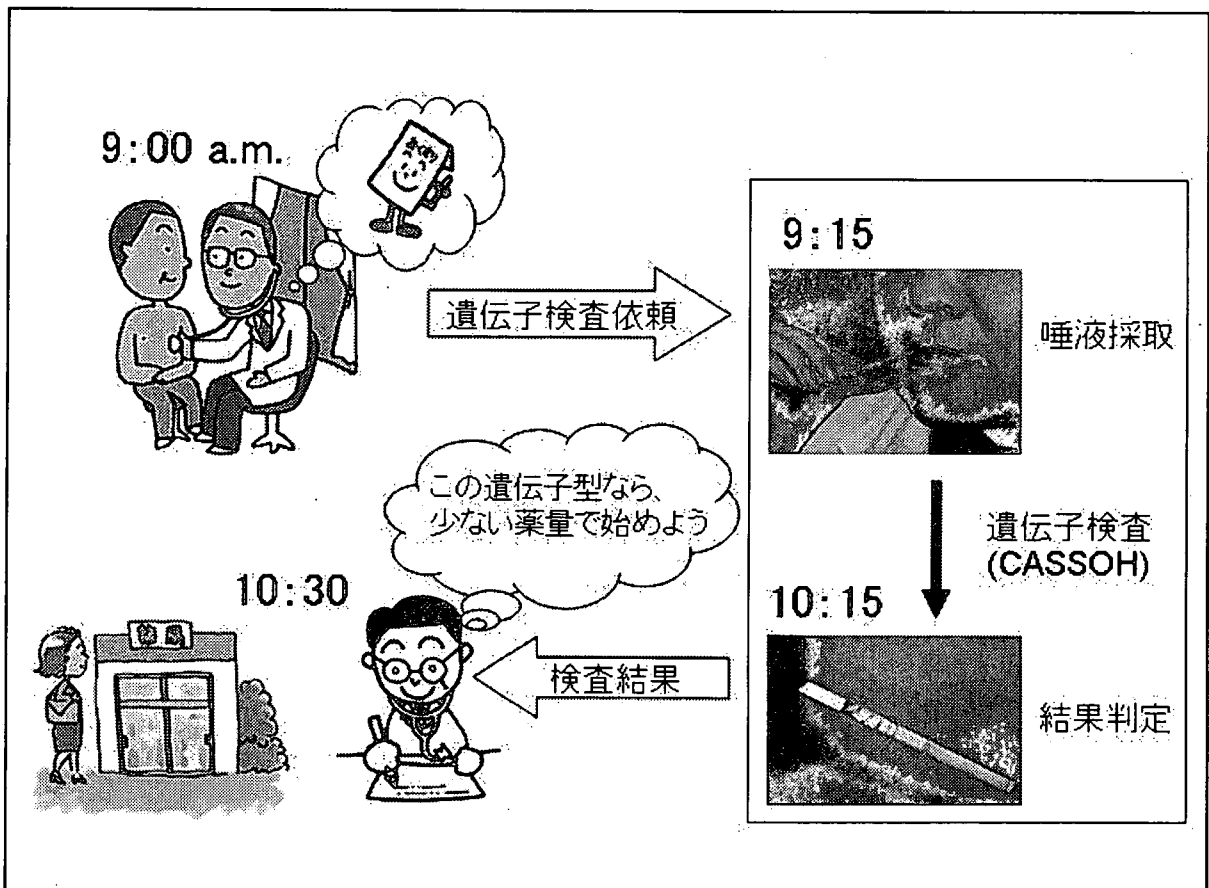
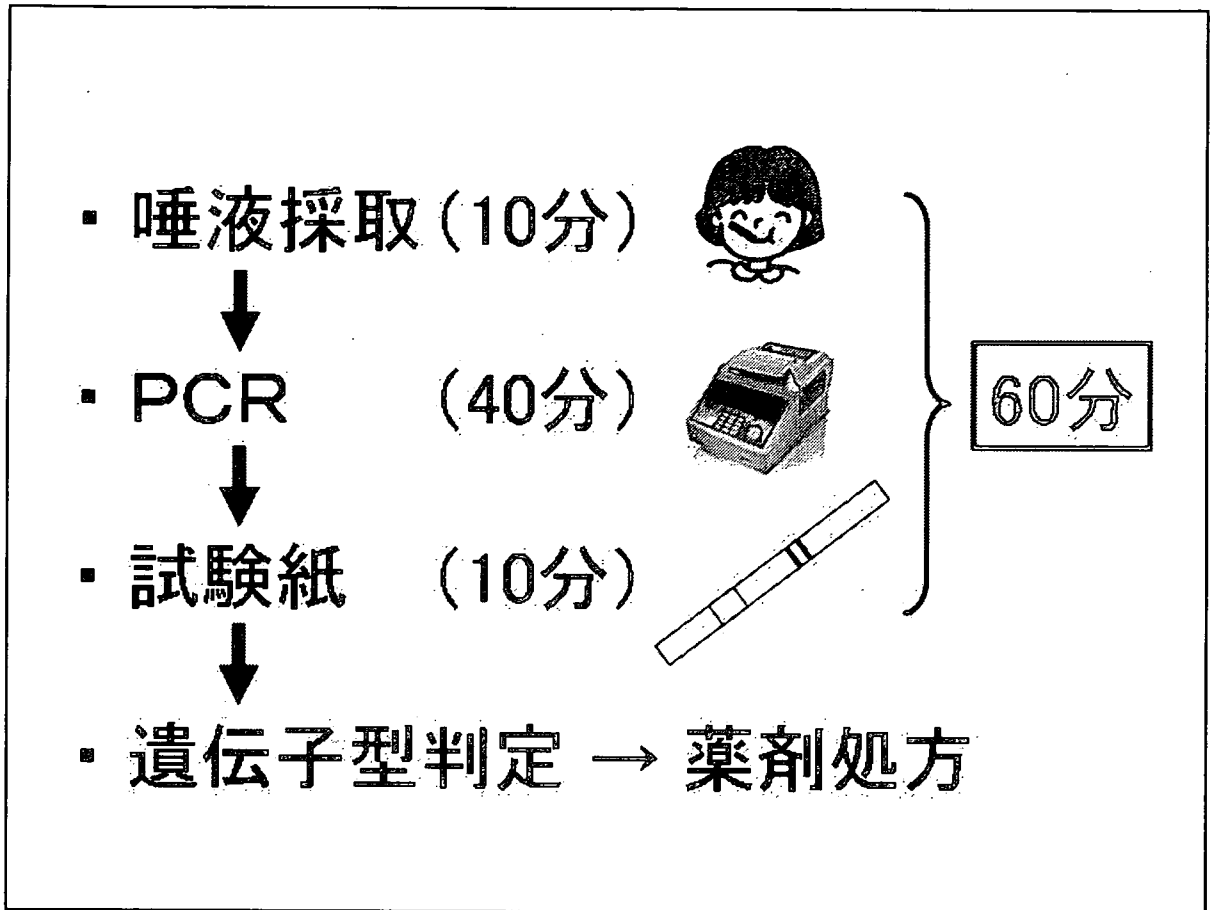




図2. 日経産業新聞の一面トップに掲載された本研究の成果 (平成 19 年 8 月 23 日)

# 日経産業新聞

2007年(平成19年)  
8月23日  
木曜日

## オーダーメイド医療

# 遺伝子個人差 唾液で判定

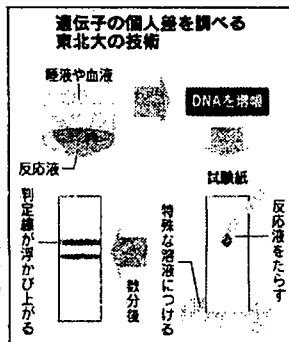
東北大学の松原洋一教授と興業大・准教授は、薬の副作用の有無などに関連する遺伝子の個人差であるSNP(一塩基多型)を唾液(吐きき)で簡単に判定できる技術を開発した。専用の試験紙を使い1時間ほどで済む。これまで専門の医師や検査機関が手がけていた判定が、小規模な診療所などでも可能になる。患者ごとに最適な医療を提供するオーダーメイド医療の普及に役立ちました。

## 東北大、所要1時間

新技術は患者から少量の唾液を採取、含まれるDNA(デオキシリボ核酸)を数十分の一の一般的な装置で増幅し、SNP(一塩基多型)を専用の試験紙にたたく。試験紙の端を測るとSNP(一塩基多型)を特定する。特別な化学物質を添付してあり、DNAの塩基配列の違いによって試験紙上の異なる場所が浮かび上がるので、結果が一目でわかる。年内に夏かいらしや

## 診療所でも可能

抗がん剤などの副作用や、液の判定での精度の差など効き方のSNPを試験紙でも研究する。試験紙で調べる臨床試験を東北カーンで協力して早期大規模化を目指す。今年度中にほかの病院にも導入を予定している。患者に負担を減らす。採血するより患者の負担を減らす。採血するより患者の負担を減らす。採血するより患者の負担を減らす。



▼SNP 遺伝子を構成しているのが明らかになる塩基配列の中に、かたがたSNP(一塩基多型)と呼ばれる塩基の個人差がある部分。この違いが一人ひとりに合わせて効果的かどうかの体質を決め、薬の副作用を減らす。オーダーメイド医療が実現する病気の予防や治療に役立つと期待されている。

られたという。従来装置は数百円以上かかり、調べるのは大規模な病院や検査機関が中心で、外費の効き方や副作用に影響を及ぼすと結果が出るとまで一週間程度の見つかったり、オーダーメイド医療の実現が期待されている。

## II. 分担研究報告

分担研究報告書

CASSOH法の臨床応用へ向けての検討

分担研究者 松原 洋一 (東北大学大学院・教授)

研究要旨

本分担研究の目的は、私たちが独自に考案したCASSOH法を応用して、一般病院でも簡便・迅速にsingle nucleotide polymorphism (SNP)が検出できるベッドサイド遺伝子診断法を確立することである。本年度は、実際に臨床の場で遺伝子検査を行うことに関連する種々の項目について検討を行った。とくに遺伝カウンセリングのあり方について考察を加えた。

A. 研究目的

薬物代謝酵素や薬物標的分子等の遺伝子多型に起因する薬物動態・薬効・副作用発現等の個人差をあらかじめ遺伝子検査によって同定し、その結果を基に個別化薬剤処方をおこなう「テーラーメイド医療」を具現化するためには、一般病院でも施行が可能な簡便かつ迅速な遺伝子検査法(SNP検出法)の確立が急務である。

私たちが独自に開発した遺伝子診断法(CASSOH法)は、高額な特殊機器を使用することなく2ステップの操作を行うだけの簡便・迅速な手法で、検体採取から2時間以内にSNPの遺伝子型判定が可能な、これまでにない手法である。

昨年度までの研究によって当初の研究計画の相当部分が達成されたため、今年度は臨床応用へ向けてのさらなる実際的な検討を行った。

B. 研究方法

① CASSOH法を用いた前臨床試験の対象となる薬理的遺伝子多型の選定

実際に前臨床試験を行なう対象とする薬理的遺伝子多型について、その選定基準について検討を加えた。さらにその要件を満たす薬理的遺伝子多型を抽出した。

② インフォームド・コンセントおよび遺伝カウンセリングについての検討

前臨床試験行なうために必要なインフォームド・コンセントと遺伝カウンセリングの方法や内容について、三省指針および遺伝関連学会のガイドラインに沿って検討をおこなった。

③安全性・非侵襲性の検討

薬理的遺伝子多型の遺伝子検査は、現時点の医療レベルでは、患者の診断・治療に必要な不可欠なものではない。したがって、その実施に当たっては、可能な限り、危険性・侵襲性を低くする必要がある。その方策について検討を加えた。

## C. 研究結果

### ① CASSOH法を用いた前臨床試験の対象となる薬理的遺伝子多型の選定

実際に前臨床試験を行なう対象とする薬理的遺伝子多型については、当面、以下の選定基準が必要であると考えられた：

- ・臨床的有用性のエビデンスが複数の研究報告で確認されており、しかも専門家の間ではほぼ一致して認められていること。
- ・CASSOHの特性上、1～数種のSNPを検出するだけで予測効果が大きく期待できるもの。
- ・上記の事項に関連して、遺伝子多型検査結果の解釈が比較的単純で複雑なアルゴリズムを要しないこと。
- ・迅速にその薬理的遺伝子多型を検出することが、当該患者にとってメリットがあると考えられること。
- ・重篤な疾患の発症前診断などの重大な遺伝学的情報が、偶発的に同定される可能性がきわめて低いこと。

以上の要件を満たすものとして、以下のような薬理的遺伝子多型が抽出された：

ミトコンドリア1555A>G  
CYP2C19\*2 (681G>A)  
CYP2C19\*3 (636G>A)  
TPMT\*3C (719A>G)  
NAT2\*5, NAT2\*6, NAT2\*7  
CYP2C9\*3 (1075A>C) + VKORC1 (1639G>A)

### ② インフォームド・コンセントおよび遺伝カウンセリングについての検討

前臨床試験である以上、十分なインフォームド・コンセントは必須である。遺伝カウ

ンセリングについても、三省指針に沿った対処が必要と考えられる。しかしながら、遺伝性疾患の遺伝カウンセリングのように重大な倫理的・社会的問題や家族間の葛藤を内包しているわけではないため、必要以上に遺伝子検査一般の危険性を強調する事は避ける必要があると思われる。また、遺伝性疾患の遺伝カウンセリングでしばしば必要とされるプレカウンセリング、長時間にわたる遺伝カウンセリング、フォローアップなどをそのままあてはめることは、被験者に過大な負担をかけるだけでなく、逆に不安をあおることになりかねない。したがって、当面はカウンセリング経験が豊かな医師（例えば、臨床遺伝専門医資格を有する医師）による、要点を抑えた簡潔な遺伝カウンセリングが望ましいと考えられる。

### ③安全性・非侵襲性の確保

これまで、遺伝子検査は血液を用いて行なわれるのが通例であったが、採血に伴う危険性・侵襲性については、過小評価される傾向にあった。重篤な疾患の診断に伴う遺伝子検査については、痛みや恐怖を伴う穿刺と採血は許容されうると考えられるが、投薬や投薬量の決定だけにもちいられる検査情報をえるためにはより良い手技が必要と思われる。この点において、本研究で開発された唾液検体を用いる手法は、検査精度を犠牲にすることなくこの問題を解決できるものとして積極的に推奨されるべきである。

## D. 考察

個別化薬物療法のための遺伝子診断を一般病院で普及させるためには、今後、十分な前臨床試験を行なうとともに、一般病院で実施が可能なプロトコールを作成する必要がある。この中で、すでにインフォームド・コンセントはほとんどすべての医療行為に伴って必要とされてきているが、遺伝カウンセリングは多くの病院にとって未経験の分野である。一方、従来の遺伝カウンセリングは、重篤な遺伝性疾患を扱うセンター施設において、遺伝医療の専門家がチームを作り、膨大な時間と労力をかけ、採算を度外視しておこなってきている。このような遺伝カウンセリング体制を一般医療機関に求めることは不可能なだけでなく、むしろ不必要とあってよい。この点については、重大な倫理的・社会的問題や家族間の葛藤を想定して定められた現在の三省指針を見直し、その運用をより柔軟にしていく必要があると思われる。

## E. 結論

薬理遺伝学的検査の前臨床試験を実施するにあたり、考慮すべき諸項目について検討を加えた。個別化薬物療法のための遺伝子診断にともなう遺伝カウンセリングについては、現在の三省指針の運用をより柔軟にする必要があると思われる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### (1) 論文発表

- 1) Makita Y, Narumi Y, Yoshida M, Niihori T, Kure S, Fujieda K, Matsubara Y, Aoki Y. Leukemia in Cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: a patient with a germline mutation in BRAF proto-oncogene. *J Pediatr Hematol Oncol* 29:287-90, 2007.
- 2) Kanno J, Kure S, Narisawa A, Kamada F, Takayanagi M, Yamamoto K, Hoshino H, Goto T, Takahashi T, Haginoya K, Tsuchiya S, Baumeister FA, Hasegawa Y, Aoki Y, Yamaguchi S, Matsubara Y. Allelic and non-allelic heterogeneities in pyridoxine dependent seizures revealed by ALDH7A1 mutational analysis. *Mol Genet Metab* 91:384-9, 2007.
- 3) Narumi Y, Aoki Y, Niihori T, Neri G, Cave H, Verloes A, Nava C, Kavamura MI, Okamoto N, Kurosawa K, Hennekam RC, Wilson LC, Gillessen-Kaesbach G, Wiczorek D, Lapunzina P, Ohashi H, Makita Y, Kondo I, Tsuchiya S, Ito E, Sameshima K, Kato K, Kure S, Matsubara Y. Molecular and clinical characterization of cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: overlapping clinical manifestations with Costello syndrome. *Am J Med Genet A* 143:799-807, 2007.
- 4) Kanno J, Hutchin T, Kamada F, Narisawa A, Aoki Y, Matsubara Y, Kure S. Genomic deletion within GLDC is a major cause of non-ketotic hyperglycinaemia. *J Med Genet* 44:e69, 2007.
- 5) Nava C, Hanna N, Michot C, Pereira S, Pouvreau N, Niihori T, Aoki Y, Matsubara Y, Arveiler B, Lacombe D, Pasmant E, Parfait B, Baumann C, Héron D, Sigaudy S, Toutain A, Rio M, Goldenberg A, Leheup B, Verloes A, Cavé H. Cardio-facio-cutaneous and Noonan

syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype-phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. J Med Genet. 44:763-71, 2007.

6) Sakamoto O, Ohura T, Matsubara Y, Takayanagi M, Tsuchiya S. Mutation and haplotype analyses of the MUT gene in Japanese patients with methylmalonic acidemia. J Hum Genet. 52:48-55, 2007.

7) 松原洋一：存亡の危機に瀕する稀少遺伝性疾患の遺伝子検査、医学のあゆみ（印刷中）

## （2）学会発表

Kure S, Hiratsuka M, Ebisawa A, Kamada F, Komatsuzaki S, Kanno J, Narisawa A, Aoki Y, Mizugaki M, Matsubara Y. Competitive

allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) method: Applications to genotyping of clinically important SNPs in pharmacogenetics. 57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, October 23-27, 2007.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

- ・発明の名称「遺伝子変異検出法」
- ・出願番号 特願2002-323419
- ・国際特許出願番号 PTC/JP03/14204
- ・出願国 PTC

<研究協力者> 鎌田文顕、呉 繁夫

分担研究報告書

「CASSOH法に用いる唾液検体の採取器具の検討」

分担研究者 呉 繁夫 (東北大学大学院・准教授)

研究協力者 鎌田文顕 (東北大学大学院・流動研究員)

研究要旨

CASSOH法実施には、DNAを含む臨床検体が必要とする。昨年度の検討で、DNAのソースとなる臨床検体として血液の代わりに唾液を用いると迅速化・簡便化が可能である事を報告した。今年度は、唾液を定量的かつ容易に採取する器具の検討をおこなった。採取器具は、1)小児などから簡便に採取が可能であること、2)口腔内へ入れても安全であること、3)定量的な採取が可能であること、4)被検者の唾液に直接接触することなく処理が可能であること、などの要件を満たすことが望ましい。この観点から幾つかの器具を検討し、柄付きスポンジを用いた方法を採用した。昨年度開発した唾液処理液を組み合わせることで、迅速簡便な個別化医療に役立つ唾液採取器具をデザインすることが出来た。

A. 研究背景と目的

オーダーメイド薬物療法を目的とする遺伝子診断法の実践のためには、ベッドサイドや外来で迅速かつ簡便に一塩基多型(SNP)を決定する検出系の開発が必須である。私たちは、この検出系としてイムノクロマトを応用したCASSOH法を開発した。CASSOH法はPCRにて増幅されたSNP部位を含む遺伝子断片に対し、それぞれの対立遺伝子に相補的な2種類のオリゴヌクレオチド・プローブを準備し、いずれのプローブが選択的に結合するかを金標識された抗体の沈降線で検出するものである。CASSOH法での検出には、DNAを含む検体の採取とPCR反応による遺伝子断片の増

幅が必要である。今までDNAを含む検体として血液が使われてきた。しかしながら、血液検体には、採取時に痛みを伴う、感染リスクが高いなどの欠点がある。そこで、血液検体に代わるDNAソースとして唾液を思いつき、昨年度その有用性を検討した。今年度は昨年度の研究結果を基に、唾液を簡便かつ定量的採取する器具の検討をおこなった。

まず、市販されている唾液採取器具を検討し、その上で本研究に適した器具をデザインし、試作した。

## B. 研究方法

### ① 唾液検体の採取

成人ボランティアからの唾液検体の採取は、研究の内容、方法、意義に関し十分な説明後、インフォームド・コンセントを得た上で唾液を採取し以下の研究に用いた。(本研究は、東北大学医学部倫理医員会で審議され、承認されている。承認番号 2006-78)。

### ②市販の唾液採取器具の検討

幾つかの市販されている唾液採取器具を購入し、その特性を検討した。

### ③唾液吸収素材の検討

唾液を吸収する素材として、ろ紙 (ADVANTEC 63G、TOYO ろ紙、)、スポンジ (セルロース製、IVALON)、スポンジ (ポリビニールアセタール PVA 製、IVALON)、の3種類。同体積の素材を切り出し重量を測定後、唾液を吸収させる。その後重量を再度測定し、吸収された唾液量を評価した。

### ④唾液処理法

②の器具で採取した唾液の9倍量の唾液処理液を添加する。その後 55°C で 10 分間加温、98°C 10 分間過熱処理後、PCR 反応液を行った。PCR 反応系へは、処理後の唾液を 1/10 量添加して PCR 反応を行った。増幅遺伝子は ALDH2 エクソン 12 の DAN 断片 (200 bp)。

### ⑤PCR産物のCASSOH法による解析

④の増幅を終えたPCR反応液 5 ul を CASSOH スティックに添加後、展開バッファーにスティックの一端を浸し、室温で5分後に結果を判定した。その他の詳しい条件は、既報 (Matsubara & Kure, *Hum Mutat*, 2003) に従

った。

## C. 研究結果

### ① 市販の唾液採取器具の検討

市販品を検討した結果、大きく分けて2種類の器具が販売されていた。一つ目は、図1に示すような、自力で唾液を容器内へ入れるタイプのものである。このタイプのものは、新生児・乳児などでは使用できない事に加え、定量的に採取することが困難である。

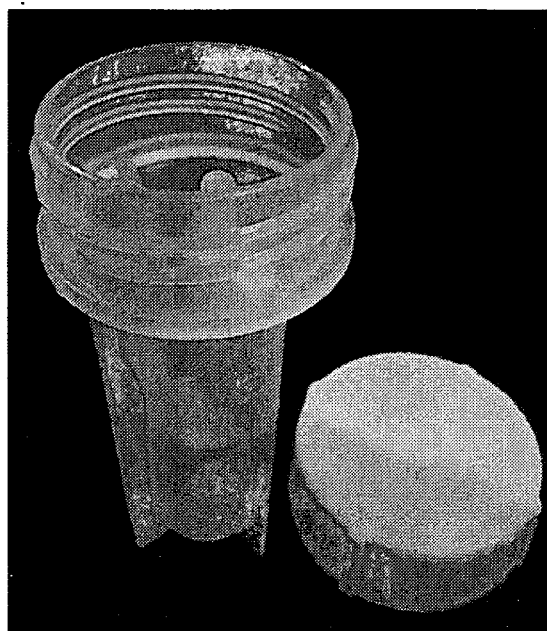


図1 自排出型唾液採取器具(市販品)

この容器で約 2 ml の唾液を採取できる。

もう一つのタイプは、図2のようにスポンジやろ紙などの唾液を吸収するタイプのものである。このタイプのものであれば、新生児や乳児からでも容易に唾液採取が可能である。更に吸収素材の限界まで唾液を浸み込ませることである程度の定量的吸収も期待できる。



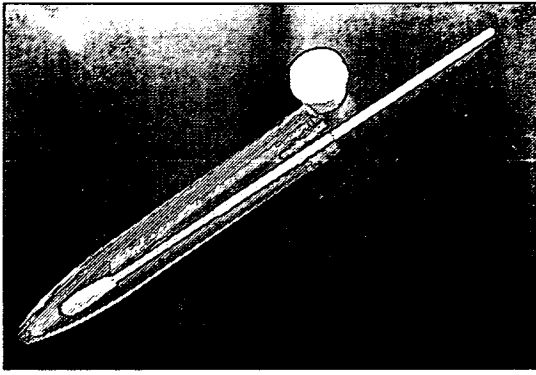


図2 吸収型唾液採取器具(市販品)

② 吸収素材（ろ紙、セルロース、PVAスポンジ）の比較

ろ紙は、唾液を染ませると繊維がばらばらになり、回収が困難となったため断念した。セルロース製とPVAスポンジはいずれも良い回収を示したが、回収率ではPVAスポンジの方が20%程度優れていた（図3）。

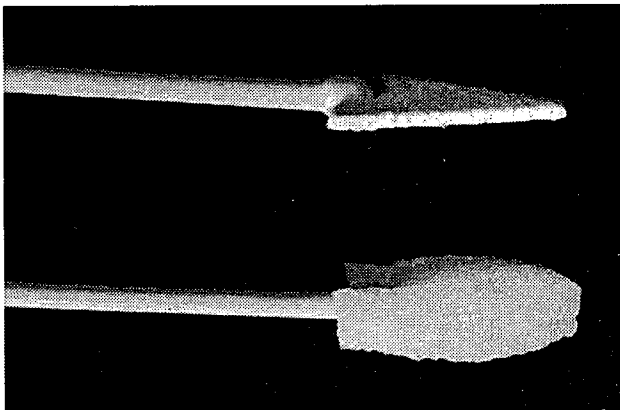


図3 セルロース製スポンジによる唾液吸収  
上は乾燥状態、下は唾液を吸収したスポンジを示す（約0.2 mlの吸収力がある）。

③ 唾液処理を用いたPCR増幅とCASSOH

唾液処理用の柄付きスポンジと昨年度検討した唾液処理液0.8 mlを入れた容器をセットにした唾液採取キットを試作した（図4右）

唾液採取の手順は、

- 1) 柄付きスポンジを口の中へ入れて30秒間唾液を吸収させる。
- 2) スポンジを取り出し、唾液処理液の入った容器内で5回上下させて唾液と処理液を混合させる（図4左）。
- 3) スポンジを捨て容器にキャップする。

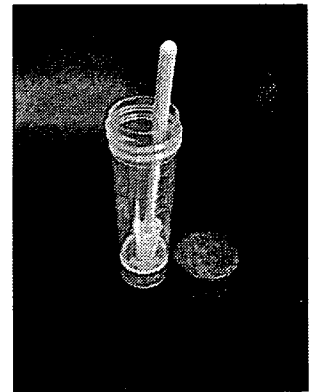


図4 唾液採取キット

この手順で作成した唾液混合液をアルミブロック・インキュベーターで55℃で5分間、98℃で5分間処理する（図5）。



図5 唾液混合液の加温処理

加温処理の終了した唾液は、そのままPCR反応液に1/10量加え、PCR増幅反応を

行う。その結果、図6に示すような十分なDNA増幅を認めた。



図6 唾液からのPCR増幅

左レーンは処理済唾液をくわえたもので、右レーンは唾液処理液を未添加のPCR反応

このPCR産物を利用して、CASSOH反応を行うと、CASSOHスティックにて明瞭な判定線が認められ、遺伝子型判定が可能であった。

#### D. 考察

今回の検討で、柄付きスポンジを用いると容易にかつ定量的に唾液の採取が可能であった。唾液の吸収力は、PVAスポンジの方がセルロース・スポンジより優れていた、しかしながら、PVAスポンジは製造過程でホルムアルデヒドを使用しており、スポンジ中に微量ながら混入している事が明らかになったため、今回はセルロース製スポンジを用い、唾液採取キットを試作した。実際にこの方法を用い、唾液を検体としてCASSOH法を行うと遺伝子診断が可能であった。唾液は、採取に痛みを伴わず、医療関係者でなくても可能である、感染のリスクが小さい、などの利点を有するため、この唾液処理キットは、個別化医療の実践に有効と考えられる。

#### E. 結論

唾液を簡便かつ定量的に採取する器具の開発を行った。昨年度に開発した唾液処理液と合わせて利用することにより、CASSOH法による遺伝子検査の迅速化を達成した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### A. 論文発表

1. Kanno J, Kure S, Narisawa A, Kamada F, Haginoya K, Hoshino H, Goto T, Takahashi T, Baumeister FAM, Takayanagi M, Aoki Y, Matsubara Y. Allelic and non-allelic heterogeneity in pyridoxine dependent seizures revealed by mutational analysis of ALDH7A1 gene. *Mol Genet Metabol* 2007;91:384-9
2. Oda M, Kure S, Sugawara T, Yamaguchi S, Kojima K, Shinka T, Sato K, Narisawa A, Matsubara Y, Omae T, Mizoi K, Kinouchi H. Direct correlation between ischemic injury and extracellular glycine concentration in mice with genetically altered of the glycine cleavage multienzyme system. *Stroke* 2007;38:2157-64
3. Takano K, Nakagawa E, Inoue K, Kamada F, Kure S, Goto Y. A loss-of-function mutation in the FTSJ1 gene causes nonsyndromic X-linked mental retardation in a Japanese family. *Am J Med Genet* 2007, Dec 14 online

##### B. 学会発表

1. 小児科外来・ベッドサイドで実施可能な迅速・簡便な遺伝子診断法の開発と応用 呉 繁夫、鎌田文顕、菅野潤子、鳴海洋子、新堀哲也、青木洋子、松原洋一 第110回日本小児科学会学術集会、京都、2007年4月
2. ピリドキシン依存性けいれん：ALDH7A1

変異解析で見出された遺伝的背景の異質性 菅野潤子、呉 繁夫、鎌田文顕、山本克哉、高橋孝雄、萩野谷和也、土屋滋、青木洋子、松原洋一 第110回日本小児科学会学術集会、京都、2007年4月

3. グリシン脳症（非ケトーシス型高グリシン血症）の新しい酵素診断法と遺伝子診断法の開発 呉 繁夫 第49回日本小児神経学会総会 大阪、2007年7月

4. ピリドキシン依存性けいれん：ALDH7A1変異解析で見出された遺伝的背景の異質性 菅野潤子、呉 繁夫、鎌田文顕、山本克哉、高橋孝雄、萩野谷和也、土屋滋、青木洋子、松原洋一 第110回日本先天代謝異常学会総会、山形、2007年11月

- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

薬物代謝酵素遺伝子多型の酵素活性に与える影響

分担研究者 水柿 道直 東北薬科大学教授

研究要旨

抗がん剤である6-メルカプトプリン(6-MP)は生体内でチオプリンメチルトランスフェラーゼ(TPMT)及びキサンチンオキシダーゼ(XO)によって解毒代謝される。我々はこれまでにCASSOH法を用いたTPMT遺伝子多型の検出法を確立して来たが、XO遺伝子に関する遺伝子多型情報はほとんど報告されていないため、CASSOH法による検出系作成には至っていない。そこで今回、NCBIのデータベース上に公開されているSNP情報を基に、21種類の遺伝子多型を導入したXOバリエント酵素を、それぞれCOS-7細胞に発現させた。これらの発現タンパクを用い、キサンチンを基質としてin vitro代謝させ、代謝物をHPLCで定量し、酵素活性を測定した。さらに酵素速度論的解析により、各バリエント酵素のキネティックパラメータを算出した。その結果、21種類の変異型XOのうち、Arg149Cys及びThr910Lys型では酵素活性が検出限界以下、Arg607Gln、Thr623Ile、Asn909Lys及びCys1318Tyr型では酵素活性の有意な低下が認められた。また、His1221Arg型で酵素活性の有意な上昇が認められた。したがって、6-メルカプトプリン投与患者の薬効や副作用を予測する上で、TPMTの遺伝子多型だけでなくXOの遺伝子多型も重要であることが示唆された。

A. 研究目的

キサンチンオキシダーゼ(XO)は生体内において、プリン代謝の最終段階を触媒する酵素であり、医薬品では6-メルカプトプリン(6-MP)の肝臓での解毒代謝に関与している。6-MPは急性リンパ性白血病(ALL)の治療に汎用されているが、その重篤な副作用として骨髄抑制や肝機能障害などがある。近年、薬物代謝酵素の遺伝子多型が医薬品の副作用発現に影響を及ぼすことが数多く報告されており、この6-MPの副作用においても6-MPの標的細胞の代謝酵素であるチオプリンS-メチルトランスフェラーゼ(TPMT)の遺伝子多型が副作

用発現に関与することが知られている。しかし、TPMT遺伝子多型のみで6-MPの副作用全てを説明できるわけではなく、特に肝機能障害においてはその発現とTPMT遺伝子多型との関係は現在までに報告されておらず、他の要因の関与が考えられる。

XOは6-MPの肝臓での主要代謝酵素であるため、その遺伝子多型による酵素活性の異常が6-MPの副作用、特に肝障害に影響を及ぼす可能性がある。XOの遺伝子多型は現在までに20種類以上が報告されているが、それらの酵素活性に与える影響は未だ解明されていないものが多い。そこで今回、報告のある多