

200707017B

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17～19年度 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 13
III. 研究成果の刊行物・別刷 17

I . 総合研究報告

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

主任研究者 松原 洋一（東北大学大学院・教授）

研究要旨：

本研究において、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した。使用する検体としては、血液ではなく唾液を用いる安全で非侵襲的な手法を開発した。これらの手法を用いて、臨床的に特に有用と考えられる各種の遺伝子多型について検出法を確立するとともに、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と整理および新たな多型の同定を行い、臨床応用への基盤を整備した。本研究で確立された新しい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

開発が必要である。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った。

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

B. 研究方法

1) イムノクロマトグラフィー試験紙の改良と作成（平成17年度）

イムノクロマトグラフィー試験紙の感度向上と、安定供給および品質管理を確保するために、試験紙の各素材について再検討をおこなった。また、試験紙の低コスト化を図るために、既存の特許を可能な限り回避できるように試験紙構造を改変・簡略化した。

2) 定温度核酸増幅法の検討（平成17～18年度）

これまで、CASSOH法と組み合わせる遺伝子増幅法はPCR法を用いていたが、定温度核酸増幅法の1種であるLAMP法による遺伝子増幅とイムノクロマト試験紙による検出の組み合わせを検討した。

3) 唾液検体を用いた遺伝子診断法の開発 (平成18~19年度)

当初の計画には含まれていなかったが、研究経過中に唾液検体の有用性に注目し、血液検体の代替として検討をおこなった。

3) 臨床的に有用な薬理遺伝学的遺伝子多型情報の収集と評価 (平成17年度)

薬剤反応性に影響を及ぼすと考えられる遺伝子を文献情報よりリストアップするとともに日本人集団での多型頻度を解析した。また、日本人集団における新規の薬理遺伝学的遺伝子多型を探索するとともに、機能解析をあわせて実施した。

4) 薬物代謝酵素遺伝子多型検査への応用 (平成18~19年度)

臨床的に特に有用と考えられる各種の薬理遺伝学的遺伝子多型について、イムノクロマト試験紙を用いた検出条件の最適化をおこなった。

5) 臨床検査としての検討とキット化の試み (平成19年度)

イムノクロマト試験紙および唾液検体の採取・処理キットを作成した。

(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) イムノクロマトグラフィー試験紙の改良と作成

イムノクロマトグラフィー試験紙の感度

向上と、安定供給および品質管理を確保するために、試験紙構造そのものを改良するとともに、試験紙の各素材について再検討をおこなった。

まず試験紙構造に関しては、第1世代の試験紙のように5-10 μ lの反応液をスポットするのではなく、反応液そのものに試験紙下部を浸して毛細管現象で吸い上げる形式とした。これによって操作の簡便性を飛躍的に高めた。また、より部材数が少ない簡素なものとした。

次に、ニトロセルロースメンブラン、ポトムチップ、コンジュゲートパッドについて現在入手可能な複数社の素材を比較検討して、CASSOH試験紙に最も適したものを選択した。この過程においては、各社の経営状況や業界の動向なども参考に、安定した製品供給が期待されるかどうかも考慮した。抗体については、ロット差が大きいポリクローナル抗体から品質管理が比較的容易なモノクローナル抗体に変更した。プローブの標識物質については、ジゴキシゲニンに加えて、FITCも用いることができるようにし、将来、複数SNPの同時検出にも対応できるようにした。

以上の検討により完成した第2世代のイムノクロマト試験紙は、第1世代のものに比べ、より高感度となり、発色の立ち上がりが早くなった(図1)。

2) 定温度核酸増幅法の検討

定温度核酸増幅法の1種であるLAMP法を用いても、イムノクロマト試験紙による検出が可能であることを確認した。

3) 唾液検体を用いた遺伝子診断法の開発

本研究の経過中に、唾液検体の簡便な処理によって遺伝子増幅・診断が可能であることを見出した。唾液より得られるゲノムDNA量は頬粘膜擦過検体よりも1桁多く、血液を用いた場合と同じ検査結果が得られることを確認した。唾液を用いることで、血液検体に比べてより非侵襲的で安全な遺伝

子検査が可能となった。これらの結果を踏まえて、唾液採取器具と検体処理キットを作成した(図2)。

3) 臨床的に有用な薬理遺伝学的遺伝子多型情報の収集と評価(平成17年度)

薬剤反応性に影響を及ぼすと考えられる遺伝子を文献情報よりリストアップした。また、日本人における新規の遺伝子多型の人種差の有無、既存の遺伝子診断法の種類を調査し、日本人において遺伝子多型の頻度分布が明らかでないものに対しては、約200人の日本人ボランティア検体を用いて、SNPスクリーニングを行った。それらを整理し、総説として発表した(Clin. Chim. Acta, 363, 177-186, 2006)(表1、表2)。

次に、日本人集団における新規の薬理遺伝学的遺伝子多型を探索した。TPMT遺伝子では、エキソン3上にアミノ酸変異を伴う106G>A(Gly36Ser)を同定した。これに加え、アミノ酸変異を伴わないSNPを2種類確認した。また、CYP4A22遺伝子では、エキソン上に13箇所のSNPを同定し、さらにハプロタイプ解析により、21種バリエーションアレルを特定した。これらのバリエーションアレルは国際ヒトCYP命名委員会により、CYP4A22*1~*15と命名された。デキストロメトルファンO-脱メチル化活性を測定したところ、野生型CYP2D6と比較して、CYP2D6.2、CYP2D6.27、CYP2D6.49、CYP2D6.50及びCYP2D6.55は活性が有意に低下していた。また、CYP2D6.10、CYP2D6.14、CYP2D6.18、CYP2D6.36、CYP2D6.47、CYP2D6.51、CYP2D6.54及びCYP2D6.57においては、検出限界以下の活性であった。

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のエキソン1(173A>C;Glu58Ala)に1種及びエキソン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。

4) 薬物代謝酵素遺伝子多型検査への応用

臨床的に特に有用と考えられるミトコンドリア遺伝子の1555A>G多型、NAT2遺伝子の*5、*6、*7アレル、TPMT遺伝子のTPMT*3C(719A>G)、CYP2C19遺伝子のCYP2C19*2(681G>A)及びCYP2C19*3(636G>A)について、検出条件の最適化をおこなった。

5) 臨床検査としての検討とキット化の試み

イムノクロマト試験紙および唾液検体の採取・処理キットを作成した(図1、図2)。

D. 考察

本研究開始時の目標は、ほぼ計画通りに達成できたと考えられる。これによって、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なった。イムノクロマト試験紙法を実際に臨床の場に普及させるためには

さらに、当初の予想を超えた研究の進展によって、唾液検体を用いた遺伝子診断を開発することができた。唾液は、血液検体とは異なり、採取時の不快感や痛みがなく、肝炎などの感染症の危険がないという特徴がある。より低侵襲で安全な検査法として、広く普及することが望まれる。本研究で達成された遺伝子診断法を実際に臨床現場へ導入することによって、オーダーメイド個別化薬物療法が可能になると考えられる

(図3)。

国内外に例を見ない、迅速・簡便・安価な遺伝子検査法の開発に成功したことにより、本研究の成果は日経産業新聞の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4)。

上記の遺伝子診断システムを、実際に臨床の現場に導入していくためには、唾液処理、遺伝子増幅、イムノクロマト試験紙、結果判定をシームレスに統合し、一般の臨床検査技師が実施できるように整備していく必要がある。これによって、わが国におけるオーダーメイド薬物療法の普及が期待される。

E. 結論

本研究によって、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なった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Aoki Y, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Tanaka Y, Filocamo M, Kato K, Suzuki Y, Kure S, Matsubara Y.: Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet* 37:1038-40, 2005.

2) Niihori T, Aoki Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kondoh T, Ishikiriyama S, Kawame H, Kamasaki H, Yamanaka T, Takada F, Nishio K, Sakurai M, Tamai H, Nagashima T, Suzuki Y, Kure S, Fujii K, Imaizumi M, Matsubara Y: Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia. *J Hum Genet* 50:192-202, 2005

3) Otomo J, Kure S, Shiba T, Karibe A, Shinozaki T, Yagi T, Naganuma H, Tezuka F, Miura M, Ito M, Watanabe J, Matsubara Y, Shirato K: Electrophysiological and histopathological characteristics of

progressive atrioventricular block accompanied by familial dilated cardiomyopathy caused by a novel mutation of lamin A/C gene. *J Cardiovasc Electrophysiol* 16:137-45, 2005

4) Dinopoulos A, Kure S, Chuck G, Sato K, Gilbert DL, Matsubara Y, Degrauw T: Glycine decarboxylase mutations: a distinctive phenotype of nonketotic hyperglycinemia in adults. *Neurology* 64:1255-7, 2005

5) Flusser H, Korman SH, Sato K, Matsubara Y, Galil A, Kure S: Mild glycine encephalopathy (NKH) in a large kindred due to a silent exonic GLDC splice mutation. *Neurology* 64:1426-30, 2005

6) Boneh A, Korman SH, Sato K, Kanno J, Matsubara Y, Lerer I, Ben-Neriah Z, Kure S: A single nucleotide substitution that abolishes the initiator methionine codon of the GLDC gene is prevalent among patients with glycine encephalopathy in Jerusalem. *J Hum Genet* 50:230-4, 2005

7) Salvi F, Aoki Y, Della Nave R, Vella A, Pastorelli F, Scaglione C, Matsubara Y, Mascalchi M: Adult Alexander's disease without leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 58:813-814, 2005

8) Hiratsuka M, Sasaki T, Mizugaki M. Genetic testing for pharmacogenetics and its clinical application in drug therapy (Review). *Clin. Chim. Acta*, 363, 177-186, 2006

9) Ebisawa A, Hiratsuka M, Sakuyama K, Konno Y, Sasaki T, Mizugaki M. Two novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP2D6 gene in Japanese individuals. *Drug Metabol. Pharmacokin.*, 20, 294-299, 2005

10) Hiratsuka M, Kudo M, Koseki N, Shuta Ujiie S, Sugawara M, Suzuki R, Sasaki T, Konno Y, Mizugaki M. A novel single nucleotide polymorphism of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene in

- Japanese individuals. *Drug Metabol. Pharmacokin.*, 20, 387-390, 2005
- 11) Sasaki T, Goto E, Konno Y, Hiratsuka M, Mizugaki M. Three novel single nucleotide polymorphisms of the human thiopurine s-methyltransferase gene in Japanese individuals. *Drug Metab Pharmacokinet.* 21, 332-336, 2006
- 12) Hiratsuka M, Nozawa H, Katsumoto Y, Moteki T, Sasaki T, Konno Y, Mizugaki M. Genetic polymorphisms and haplotype structures of the CYP4A22 gene in a Japanese population. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 599, 98-104, 2006
- 13) Hiratsuka M, Ebisawa A, Sakuyama K, Matsubara Y, Kure S, Soya Y, Konno Y, Sasaki T, Kishiba A, Mizugaki M. Competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of pharmacogenetic single nucleotide polymorphisms (SNPs). *J. Biochem. Biophys. Methods*, 67, 87-94, 2006
- 14) Gripp KW, Lin AE, Stabley DL, Nicholson L, Scott Jr. CI, Doyle D, Aoki Y, Matsubara Y, Zackai EH, Lapunzina P, Gonzalez-Meneses A, Holbrook J, Agresta CA, Gonzalez IL, Sol-Church K: HRAS mutation analysis in Costello syndrome: Genotype and phenotype correlation. *Amer J Med Genet Part A* 140:1-7, 2006
- 15) Sato K, Kanno J, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S: DNA synthesis pathways in sphere-forming neural stem cells: De novo pathway, but not salvage pathway, is essential for neural differentiation. *Brain Res* 1071:24-33, 2006
- 16) Kure S, Kato K, Dinopoulos A, Gail C, DeGrauw TJ, Christodoulou J, Bzduch V, Kalmanchey R, Fekete G, Trojovský A, Plecko B, Brenningstall G, Tohyama J, Aoki Y, Matsubara Y. Comprehensive mutation analysis of GLDC, AMT, and GCSH in nonketotic hyperglycinemia. *Hum Mutat.* 27:343-52, 2006
- 17) del Toro M, Arranz JA, Macaya A, Riudor E, Raspall M, Moreno A, Vazquez E, Ortega A, Matsubara Y, Kure S, Roig M. Progressive vacuolating glycine leukoencephalopathy with pulmonary hypertension. *Ann Neurol* 60:148-52, 2006.
- 18) Kure S, Korman SH, Kanno J, Narisawa A, Kubota M, Takayanagi T, Takayanagi M, Saito T, Matsui A, Kamada F, Aoki Y, Ohura T, Matsubara Y. Rapid diagnosis of glycine encephalopathy by ¹³C-glycine breath test. *Ann Neurol* 59:862-7, 2006.
- 19) Kamada F, Kure S, Kudo T, Suzuki Y, Oshima T, Ichinohe A, Kojima K, Niihori T, Kanno J, Narumi Y, Narisawa A, Kato K, Aoki Y, Ikeda K, Kobayashi T, Matsubara Y. A novel KCNQ4 one-base deletion in a large pedigree with hearing loss: implication for the genotype-phenotype correlation. *J Hum Genet* 51:455-60, 2006.
- 20) Hiratsuka M, Ebisawa A, Sakuyama K, Matsubara Y, Kure S, Soya Y, Konno Y, Sasaki T, Kishiba A, Mizugaki M. Competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of pharmacogenetic single nucleotide polymorphisms (SNPs). *J Biochem Biophys Methods* 67:87-94, 2006.
- 21) Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cave H, Verloes A, Okamoto N, Hennekam RC, Gillissen-Kaesbach G, Wieczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Wilson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y. Germline KRAS and BRAF mutations in

- cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet* 38:294-6, 2006.
- 22) 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
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) Kudo M, Moteki T, Sasaki T, Konno Y, Ujiie S, Onose A, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. Functional characterization of human xanthine oxidase allelic variants. *Pharmacogenet. Genom.*, 18, 243-251, 2008.
- 31) 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) 呉 繁夫、菅野潤子、青木洋子、平塚真弘、松原洋一、アミノグリコシド系抗生剤による難聴：ミトコンドリア1555A>G変異の遺伝子検査と遺伝相談、日本小児科学会宮城地方会、仙台、2005年6月
- 2) 呉 繁夫、菅野潤子、青木洋子、平塚真弘、松原洋一、第12回日本遺伝子診療学会大会、アミノグリコシド系抗生剤による難聴：ミトコンドリア1555A>G変異の遺伝子検査と遺伝カウンセリング、松本、2005年8月
- 3) 作山佳奈子、平塚真弘、呉繁夫、松原洋一、

金野由美子、佐々木崇光、水柿道直、アミノグリコシド系抗生剤による副作用の回避を目的としたミトコンドリアDNA1555A>G多型遺伝子診断と遺伝カウンセリング、第44回日本薬学会東北支部大会、仙台、2005年10月

4) 工藤 睦、平塚真弘、金野由美子、佐々木崇光、小関奈那美、水柿道直、Denaturing HPLCを用いたMethylenetetrahydrofolate Reductaseの遺伝子多型解析、第44回日本薬学会東北支部大会、仙台、2005年10月

5) 佐々木崇光、後藤英美、金野由美子、平塚真弘、水柿道直、石川正明、Denaturing HPLCを用いたチオプリンS-メチルトランスフェラーゼ(TPMT)のSNP探索、日本薬学会第127回年会、富山、2007年3月

6) Sakuyama K, Sasaki T, Hiratsuka M, Ebisawa A, Konno Y, Mizugaki M, Functional analysis of the allelic variants of the CYP2D6 gene in the Japanese population, 16th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Budapest, Hungary, September 2006

7) 菅野潤子、鎌田文顕、成澤あゆみ、青木洋子、呉繁夫、松原洋一、新しい欠失変異検索法であるMLPA法による非ケトーシス型グリシン血症の遺伝子診断、日本人類遺伝学第51回大会、米子、2006年10月

8) 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

9) 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

10) 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

11) 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. 改良型イムノクロマト試験紙 (CASSOH ver2.0)

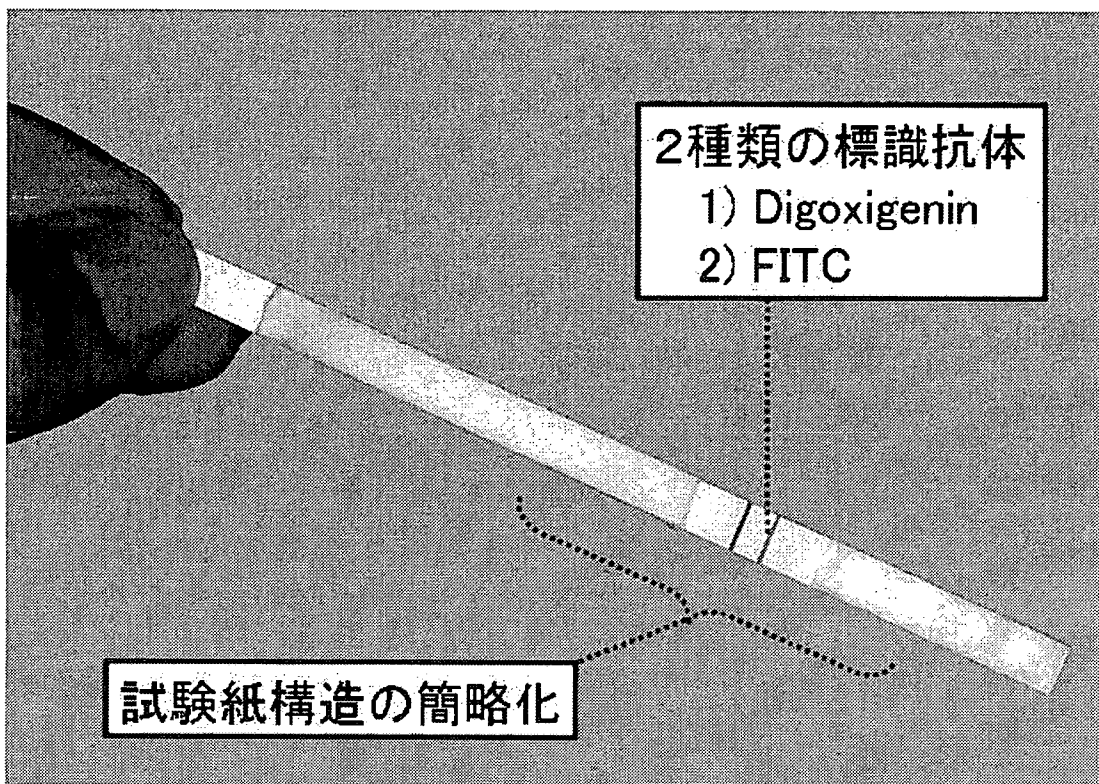


図2. 新たに開発した唾液採取・処理キット

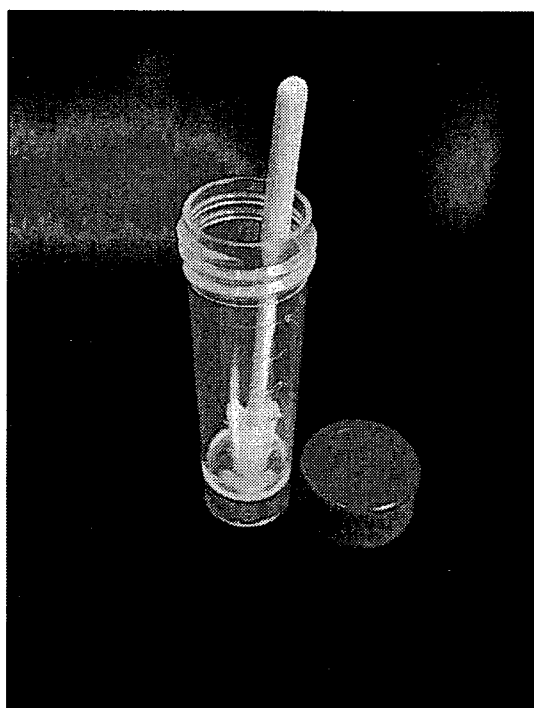


図3. 本研究によって実現可能となったベッドサイド遺伝子診断による個別化薬物療法

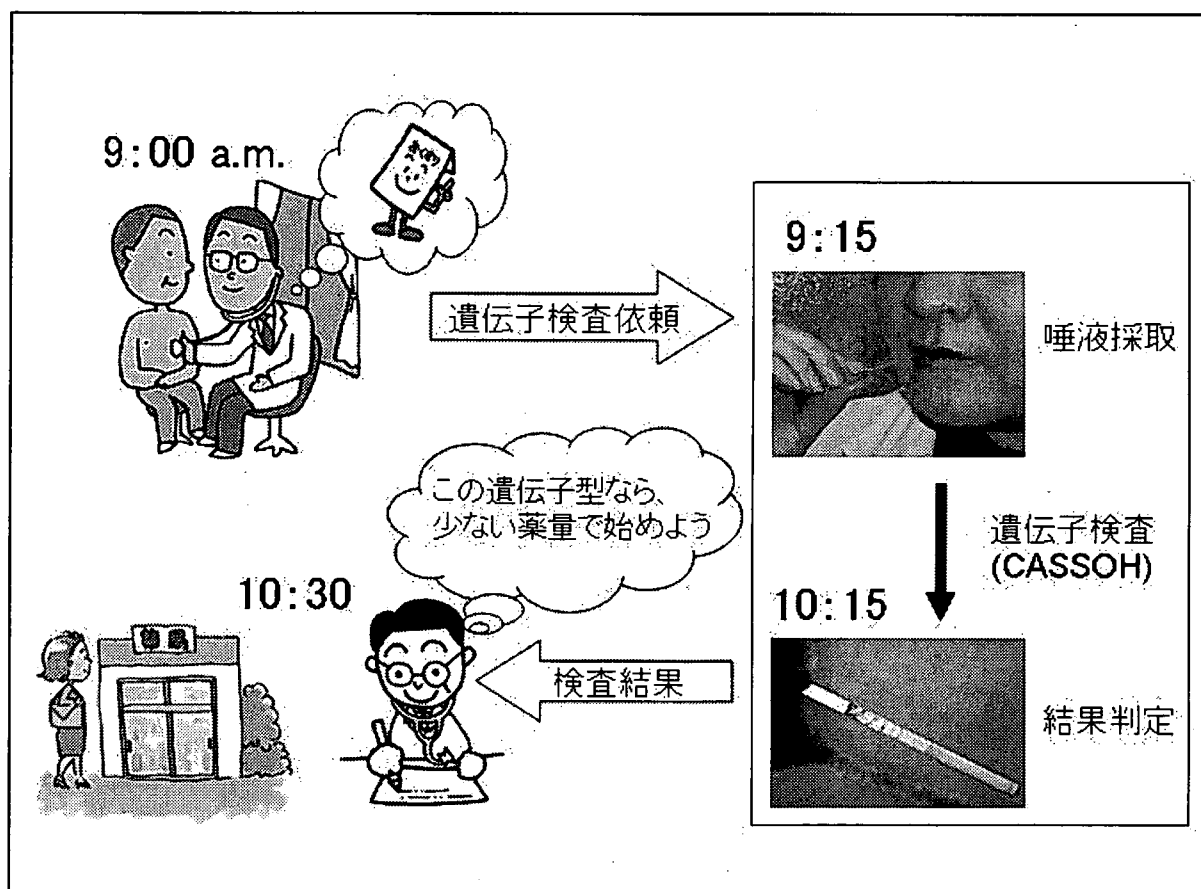
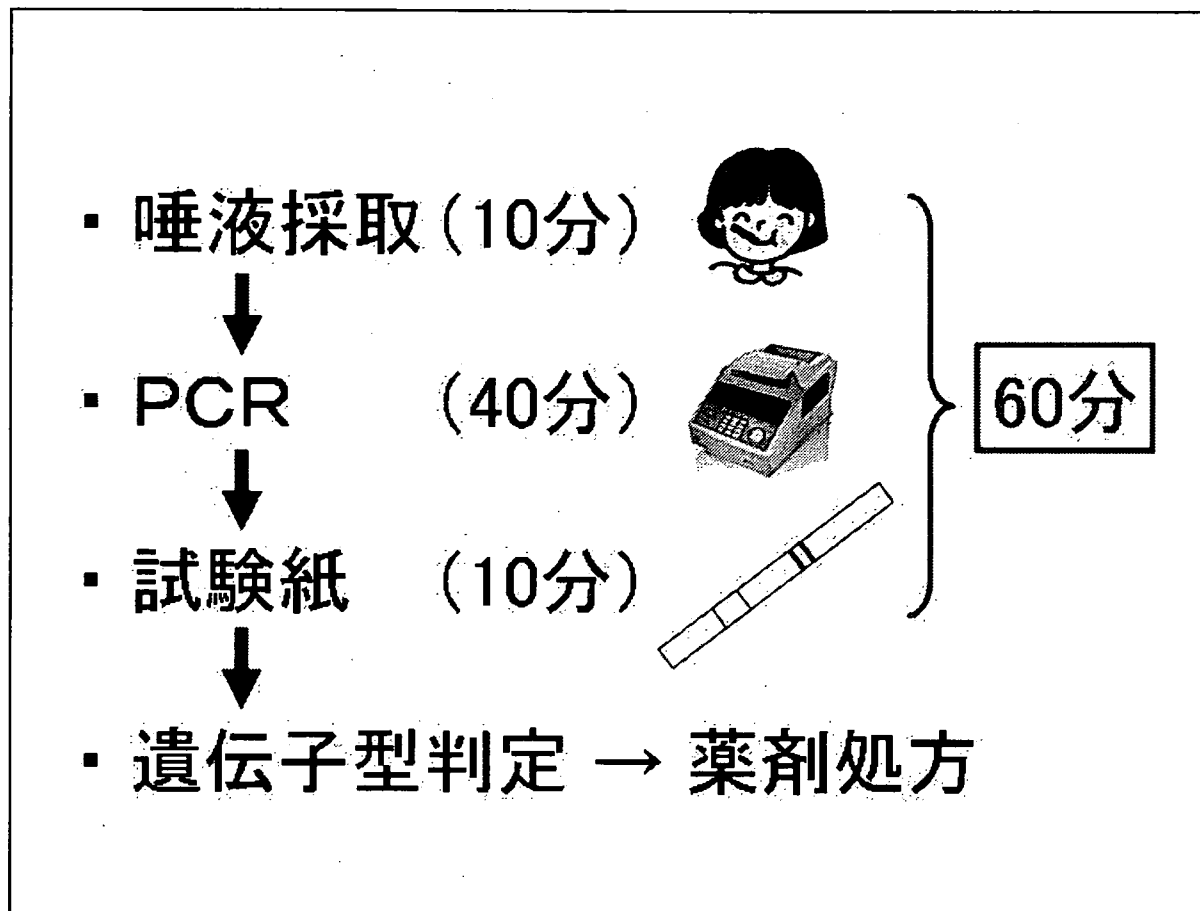


図4. 日経産業新聞の一面トップに掲載された本研究の成果 (平成 19年 8月 23日)

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

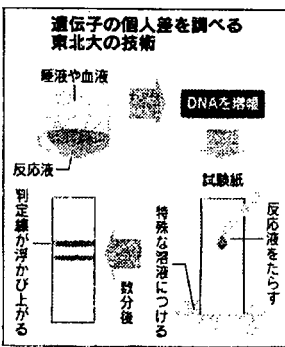
東北大学の松原洋一教授と眞榮夫・准教授は、薬の副作用の有無などに関連する遺伝子の個人差であるSNP（塩基多型）を唾液でさえ簡単に判定できる技術を開発した。専用の試験紙を使い1時間は済む。これまで専時の技術や検査機関が手掛けていた判定が、小規模な診療所などでも可能になる。患者ごとに最適な医療を提供するオーダーメイド医療の普及に役立つと期待された。

東北大、所要1時間

新技術は患者から少量の唾液採取、含まれるDNA（デオキシリボ核酸）を数平方センチメートルの試験紙に増幅し、SNP（塩基多型）を専用の試験紙に判定する。試験紙の端を測りたいSNPごとに異なる特殊な溶液につけて数待つ。試験紙には特殊な化合物などを付けておき、DNAの塩基配列の違いによって試験紙上の異なる場所に着かひ上がるので、結果が一目でわかる。

診療所でも可能

抗がん剤などの副作用や、効果方の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など協力して早期大学病院で始める。今年の実用化を目指す。座中にほかの病院にも提供。百人を対象にアルゴリズムで判定する。血液からでも判定できるが、唾液の方が調べる実験では、特殊採血するより患者の負担が少なく手軽。唾液と血液採取技術と同じ結果が得



▼SNP 遺伝子を構成している影響する遺伝子が明らかになる塩基配列の中にあかたはなってきた。SNPは同じ塩基配列とは異なる塩基を占めている。遺伝子から部分、SNPの違いが一人一人の体質に合わせて効果的かどうかの体質を決め、薬な治療方法を通じてオーダーメイド医療が実現する。病気のなりやすさなどを期待されている。

られたという。従来装置は数平方センチ以上かかり、調べるのは大規模な病院や検査機関が中心で、外薬の効き方や副作用に影響に依頼すると結果が出るまで一〜二週間程度の見つかっており、オーダーDNAの抽出や増幅、コストはおオーダー医療の実現が期待されている。

表 1. 日本人集団におけるP450関連の薬理遺伝学的遺伝子多型 (Hiratsuka et al., Clin. Chim. Acta, 363, 177-186, 2006)

Table 2

Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes (P450)

Gene	Genotypes	Major allelic variants	Phenotypes: Frequency	
			Caucasian	Asian (Japanese)
CYP1A1	*1- *11			
CYP1A2	*1- *14	*1F, *2, *3, *4, *5, *6		
CYP1B1	*1- *26			
CYP2A6	*1- *17	*2, *4, *7, *9, *10		
CYP2A13	*1- *9			
CYP2B6	*1- *15			
CYP2C8	*1- *5			
CYP2C9	*1- *13	*3	EM: 97% PM: 3%	
CYP2C19	*1- *16	*2, *3	EM: 94-98% PM: 2-6%	EM: 80% PM: 20%
CYP2D6	*1- *51	*2 × N, *3, *4, *5, *6, *10, *17	EM: 90-97% PM: 3-10%	EM: 99% PM: 1%
CYP2E1	*1- *7	*2, *3, *4		
CYP2J2	*1- *7			
CYP2R1	*1- *2			
CYP2S1	*1- *3			
CYP3A4	*1- *19	*4, *5, *6		
CYP3A5	*1- *10	*3, *6		
CYP3A7	*1			
CYP3A43	*1- *3			
CYP4B1	*1- *7			

A description of the alleles can be found on the human cytochrome P450 allele nomenclature committee home page (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>).

EM=extensive metabolizer; IM=intermediate metabolizer; PM=poor metabolizer.

Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes (non-P450)		Phenotypes: Frequency		
Drug-metabolizing enzymes	Gene	Genotypes	Major allelic variants	
			Caucasian	Asian (Japanese)
Thiopurine S-methyltransferase	TPMT	*1- [*] 15	*2, *3 EM: 73-89% IM: 11-27% PM: 0-4%	EM: 97% IM: 3%
Dihydropyrimidine dehydrogenase	DPYD	*1- [*] 12	*2 EM: 97% PM: 3%	
N-acetyltransferase 2	NAT2	*4- [*] 19	*5, *6, *7, *14 EM: 25% IM: 25% PM: 50%	EM: 45% IM: 45% PM: 10%
UDP-glucuronosyltransferase 1A1	UGT1A1	*1- [*] 64	*6, *7, *27, *28, *29 EM: 90% PM: 10%	EM: 99% PM: 1%
Catechol O-methyltransferase	COMT		Val158Met EM: 75% PM: 25%	
Glutathione S-transferase M1	GSTM1		null	
Glutathione S-transferase M3	GSTM3		*A, *B	
Glutathione S-transferase P1	GSTP1		Ile105Val	
Glutathione S-transferase T1	GSTT1		null	

EM = extensive metabolizer; IM = intermediate metabolizer; PM = poor metabolizer

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ebisawa A, Hiratsuka M, Sasaki T, Mizugaki M, et al.	Two novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP2D6 gene in Japanese individuals	Drug Metabol. Pharmacokin.	20	294-299	2005
Hiratsuka M, Sasaki T, Mizugaki M, et al.	A novel single nucleotide polymorphism of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene in Japanese individuals	Drug Metabol. Pharmacokin.	20	387-390	2005
Aoki Y, Kure S, Matsubara Y, et al.	Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome.	Nat Genet	37	1038-40	2005
Niihori T Kure S, Matsubara Y. et al.	Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia	J Hum Genet	50	192-202	2005
Otomo J, Kure S, Matsubara Y, et al.	Electrophysiological and histopathological characteristics of progressive atrioventricular block accompanied by familial dilated cardiomyopathy caused by a novel mutation of lamin A/C gene.	J Cardiovasc Electrophysiol	16	137-45	2005
Boneh A, Kure S, et al.	A single nucleotide substitution that abolishes the initiator methionine codon of the GLDC gene is prevalent among patients with glycine encephalopathy in Jerusalem.	J Hum Genet	50	230-4	2005
Dinopoulos A, Kure S, Matsubara Y, et al.	Atypical variants of nonketotic hyperglycinemia.	Mol Genet Metabol	86	61-9	2005

Salvi F, Matsubara Y, et al.	Adult Alexander's disease without leukoencephalopathy	Ann Neurol	58	813-814	2005
Suzuki Y, Kure S, Matsubara Y, et al.	Mutations in the holocarboxylase synthetase gene HLCS.	Hum Mutat	26	285-290	2005
Flusser H, Matsubara Y, Kure S, et al.	Mild glycine encephalopathy in a large kindred due to a silent exonic GLDC splice mutation.	Neurology	64	1225-7	2005
Hiratsuka M, Sasaki T, Mizugaki M, et al.	Genetic testing for pharmacogenetics and its clinical application in drug therapy	Clin. Chim. Acta	363	177-186	2006
Hiratsuka M, Sasaki T, Mizugaki M, et al.	Competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of pharmacogenetic single nucleotide polymorphisms (SNPs)	J. Biochem. Biophys. Methods	67	87-94	2006
Niihori T, Kure S, Matsubara Y, et al.	Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome	Nat Genet	38	294-6	2006
Sasaki T, Hiratsuka M, Mizugaki M, et al.	Three novel single nucleotide polymorphisms of the human thiopurine s-methyltransferase gene in Japanese individuals	Drug Metab Pharmacokinet.	21	332-336	2006
Hiratsuka M, Sasaki T, Mizugaki M, et al.	Genetic polymorphisms and haplotype structures of the CYP4A22 gene in a Japanese population	Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.	599	98-104	2006
del Toro M, Kure S, Matsubara Y, et al.	Progressive vacuolating glycine leukoencephalopathy with pulmonary hypertension	Ann Neurol	60	148-52	2006
Kure S, Matsubara Y, et al.	Rapid diagnosis of glycine encephalopathy by ¹³ C-glycine breath test.	Ann Neurol	59	862-7	2006
Kamada F, Kure S, et al.	A novel KCNQ4 one base deletion in a large pedigree with hearing loss: Implication for the genotype-phenotype correlation.	J Hum Genet	59	862-7	2006
Kure S, Matsubara Y, et al.	Comprehensive mutation analysis of GLDC, AMT, and GCSH in nonketotic hyperglycinemia.	Hum Mutat	27	343-52	2006
Sato K, Matsubara Y, Kure S, et al.	De novo and salvage pathways of DNA synthesis in primary cultured neurall stem cells.	Brain Res	1071	24-33	2006
Gripp KW, Matsubara Y, et al.	HRAS mutation analysis in Costello syndrome: Genotype and phenotype correlation	Amer J Med Genet Part A	140	1-7	2006

Oda M Kure S, et al.	Direct correlation between ischemic injury and extracellular glycine concentration in mice with genetically altered of the glycine cleavage multienzyme system.	Stroke	38	2157-64	2007
Kanno J, Kure S, et al.	Allelic and non-allelic heterogeneity in pyridoxine dependent seizures revealed by mutational analysis of ALDH7A1 gene.	Mol Genet Metabol	91	384-9	2007
Makita Y, Kure S, Matsubara Y, et al.	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
Kanno J, Kure S, et al.	Genomic deletion within GLDC is a major cause of nonketotic hyperglycinemia.	J Med Genet	44	e69	2007
Nava C, Matsubara Y., et al.	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
Narumi Y, Kure S, Matsubara Y, et al.	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
Hanzawa Y, Sasaki T, Hiratsuka M, Mizugaki M, et al.	Three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of CYP2S1 gene in Japanese individuals	Drug Metab. Pharmacokinet.	22	136-140	2007
Sakamoto O, Matsubara Y, et al.	Mutation and haplotype analyses of the MUT gene in Japanese patients with methylmalonic acidemia.	J Hum Genet	52	48-55	2007
Kudo M, Sasaki T, Mizugaki M, Hiratsuka M, et al.	Functional characterization of human xanthine oxidase allelic variants	Pharmacogenet. Genom.	18	243-251	2008
Hanzawa Y, Sasaki T, Mizugaki M, Hiratsuka M, et al.	Genetic polymorphisms and haplotype structures of the human CYP2W1 gene in a Japanese population	Drug Metab. Dispos.	36	349-352	2008
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

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷