

別添1

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス

総合研究事業

薬効及び副作用発現の人種差に関わる

遺伝子多型に関する研究

平成17～19年度 総合研究報告書

主任研究者 千葉 寛

平成20年（2008年）3月

別添 2

目 次

I. 総合研究報告

薬効及び副作用発現の人種差に関わる遺伝子多型に関する研究----- 3

千葉 寛

資料 1 平成 17 年度総括・分担研究報告書

資料 2 平成 18 年度総括・分担研究報告書

資料 3 平成 19 年度総括・分担研究報告書

II. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 87

III. 研究成果の刊行物・別刷----- 93

別添3

I. 総合研究報告

薬効及び副作用発現の人種差に関わる遺伝子多型に関する研究

主任研究者：千葉 寛
千葉大学大学院・薬学研究院・教授

研究要旨

本研究の目的は日本人、黒人、白人種のゲノム試料に加え日本人と白人種の肝組織パネルを用いた人種差の検討、薬物動態や薬効発現に関するフェノタイプが明らかな患者DNA試料の検討など、多方面からの解析を加えることにより、薬物動態ばかりでなく、薬効及び副作用発現の人種差に関わる要因を明らかにすることである。そのため、本研究班では、ワーファリンの薬効発現関連遺伝子を越前が、グルクロン酸転位酵素分子種を鹿庭が、トランスポーターの解析を家入が、CYP3A4等のCYPを中心とした薬物動態関連遺伝子を千葉が担当し、副作用及び薬効に人種差が生じる原因と遺伝子多型との関係について検討を行った。

ワーファリンの薬効発現関連遺伝子については、CYP2C9の遺伝子多型を検討し、アジア人のワルファリン投与量（約3.0mg/日）が白人の平均値（約5.0mg/日）と比較して約50%低い人種差の原因は、主要なワルファリン作用蛋白であるVKORC1の遺伝多型が原因であることを明らかにした。この結果を含めた一連の研究成果により、米国のワルファリン添付文書において同薬物の臨床効果と毒性の個人間変動にCYP2C9およびVKORC1の遺伝多型が関係するとの言及が追記され、日本においても検討の段階に入っている。また、CYP2C9の構造領域および5'上流域の遺伝子多型によらない酵素活性の個人差要因とした発現調節に関係する核内受容体およびそのcoactivatorの関与について検討を行い、ワルファリンの光学異性体特異的および部位特異的な代謝クリアランスは共通の因子により制御されている可能性を明らかにした。

グルクロン酸転位酵素については、日本人256人について、UGT1A4の遺伝子多型を調べ、19箇所の変異を見出したがいずれも頻度は低かった。主たる多型について文献値と比較した結果、その頻度には人種差があり、また、ハプロタイプにも人種差があると考えられた。また、日本人におけるUGT1A1の活性低下に係わる遺伝子多型を確認する目的で、UGT1A1の遺伝子多型と血中総ビリルビン濃度との関連について検討した結果、白人種及び黒人種と異なり、日本人においては、Block1の#28及び#6をそれぞれ単独で2本、または両者を同時に有している場合に、UGT1A1の活性が低下することが確認された。さらに、#60と#1Bが染色体上に同時に存在している場合には、染色体の片方が#28、#6又は#60-#1Bである場合に、UGT1A1の活性低下に相加的に作用することが明らかになった。一方、ヒト肝組織30検体を用いて、UGT1A1、UGT1A9及びUGT2B7について、プロモーター領域や3'UTR領域の変異のmRNAの発現量に及ぼす影響を検討したところ、UGT1A1については、*28で発現量が低下する傾向を示し、*6では変化しないことが確認できたが、*60-*1Bの活性が低下する原因を解明することはできなかった。また、UGT1A9については、*22 (T9>T10) は発現量を増加させる傾向が認められた。

トランスポーターについては、OCT1、OCT2遺伝子多型と一定の割合でノンレスポonderが存在するメトホルミンの薬効発現との関連を検討した。その結果、メトホルミンの作用部位である肝輸送に関与するOCTsの変異の中で408Met>Val (1222A>G)の関与が明らかとなり、A型で効果が減弱する結果となった。ヒト肝でのmRNA発現量はA型で低下することから、変異保有患者ではメトホルミンの肝への取り込みが低下し、効果が減弱するものと考えられた。一方、白人では、日本人に見られない数種類の変異が効果や体内動態に関与することが報告され、大きな人種差が見られるた。BCRP、SLCO1B1の遺伝子多型については、機能評価を中心に検討を加えた。BCRPでは、421C>Aに注目し、ピタバスタチン体内動態との関連評価を行ったところ、SLCO1B1と異なり、アシッド体、ラクトン体ともにBCRP遺伝子多型の関連は見られなかった。しかし、同じHMGCo-A還元酵素阻害剤であるロスバスタチンでは、421C/Cタイプの被検者でAUCの有意な低値が観察されており、基質特異性が異なっている可能性が示唆された。一方、塩酸イリノテカンにより重篤な血液障害を認めた患者を対象に塩酸イリノテカンの体内動態とSLCO1B1及

び *UGT1A1* の遺伝子多型との関係を検討した。その結果、*UGT1A1* 遺伝子には特徴的な変異は見られなかったが、*SLCO1B1* 遺伝子型は *15 allele のホモ型であった。*15 変異は日本人で 15% 程度に見られ、ホモ型は 0.8% に見られることから、CPT-11 使用時の *OATP1B1* 遺伝子多型診断が推奨される。

CYP を中心とした薬物動態関連遺伝子については、日本人と白色人種及びヒスパニック（メキシコ系アメリカ人）の肝組織を用い、*SLCO1B1* 及び *CYP3A* mRNA 発現量をこれらの人種間で比較した。その結果、*SLCO1B1* mRNA 発現量には大きな人種差は認められなかったが、*CYP3A4* mRNA には人種間で大きな差が認められ、白人種 > 日本人 > ヒスパニックの順で発現量の平均値が大きい傾向を示した。一方、C 型肝炎治療薬であるリバビリンの取り込みに関わるトランスポーターの同定を行い、リバビリンの肝取り込みに大きく寄与する核酸トランスポーターは hENT1 であること、日本人肝検体における mRNA およびタンパク発現量には比較的大きな個人差が存在することを明らかにした。CYP1A2 については、白人種と日本人肝検体を用いて CYP1A2 の指標となる EROD 活性の比較を行なうとともに CYP1A2 の遺伝子発現に epigenetics が関わっている可能性について検討を行った。その結果、非喫煙者における日本人種と白人種肝マイクロソームにおける CYP1A2 活性には有意な人種差は認められなかったが、HepG2 細胞における CYP1A2 mRNA 発現量は 5'-aza-dC 処理により大きく上昇したことから、メチル化による epigenetics の関与が示唆された。さらに、GC-box を含む CYP1A2 プロモーターが高い転写活性化能を示し、Sp1 および Sp3 と結合すること、CYP1A2 が発現しているヒト細胞ではこの部位が 80% 非メチル化状態であるのに対し、発現していない HeLa 細胞では完全にメチル化されていること、さらに、GC-box 内 CpG 配列のメチル化は CYP1A2 プロモーター活性を大きく減少させることを明らかにした。これらの結果は、CYP1A2 遺伝子発現に GC-box 内の CpG 配列のメチル化が重要な役割を担っていることが強く示唆しており、今後エピジェネティックな遺伝子発現調節機構が CYP1A2 遺伝子発現量の個人差や人種差にどのように影響を与えるのかについて検討する必要があると考えられた。

分担研究者

越前宏俊
明治薬科大学教授

鹿庭なほ子
国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部室長

家入一郎
九州大学大学院薬学研究院准教授

A. 研究目的

国外で得られた臨床試験の結果を国内で使用するためには医薬品の効果と安全性の人種による差異を考慮しなければならない。

本研究班では、日本人、黒人、白人種のゲノム試料に加え日本人と白人種の肝組織パネルを用いた人種差の検討、薬物動態や薬効発現に関するフェノタイプが明らかな患者 DNA 試料の検討など、多方面からの解析を加えることにより、薬物動態ばかりでなく、薬効及び副作用発現の人種差に関わる要因を明らかにすることを目的に検討を行った。

具体的には、ワーファリンの薬効発現関連遺伝子を越前が、グルクロン酸転位酵素分子種を鹿庭が、トランスポーターの解析を家入が、CYP3A4 等の CYP を中心とした薬物動態関連遺伝子を千葉が担当し、副作用及び薬効に人種差が生じる原因と遺伝子多型との関係について検討を行った。

B. 研究方法

1. ワーファリンの薬効発現関連遺伝子に関する検討

ワルファリンをモデル薬物としてこの薬物の応答性の個人差に関連する動態因子として CYP2C ファミリーの遺伝子多型と応答性の個人差を検討した。また、近年 VKORC1 の遺伝多型がワルファリンの薬力学の個人差に関連する可能性が指摘されたため、この機能分子に付いても検討を加えた。さらに、近年ワルファリン応答性の個人差については CYP2C9 の構造領域および 5' 上流域の遺伝子多型だけでなく他の多くの機能分子の検討が示唆されているため、CYP2C9 遺伝子翻訳調節に関係する核内因子 PGC1 α (peroxisomal proliferator activated receptor γ -coactivator 1 α) とその

coactivator である HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) についても検討を行った。

対象検体は、協同入手した白人、黒人、アジア人サンプルと施設内倫理委員会の了承を受けた上で収集した試料を用いた。

多型検出は PCR-制限酵素断片長多型(RFLP)法などで検討した。これらの変異アレルのワルファリン投与量の個人間変動に対する関与度は多変量解析の手法を用いて NOMMEM 法で解析した。

2. グルクロン酸転位酵素分子種に関する検討

1) UGT1A4 及び UGT1A1 のタイピング

UGT1A4 の解析では、書面にて同意が得られた日本人のがん患者 88 人及び不整脈患者 108 人より得た末梢血より採取した DNA、並びに、同じく書面にて同意が得られた健康志願者 60 人より得た Epstein-Barr ウィルス形質転換リンパ芽球細胞より採取した DNA を用いた。UGT1A1 については、書面にて同意が得られた日本人健康志願者 554 人より得た Epstein-Barr ウィルス形質転換リンパ芽球細胞より採取した DNA を用いた。タイピングはシーケンス法により行った。

2) mRNA 発現量

手術で切除されたヒト肝組織 30 検体は、ヒューマンサイエンス振興財団より入手した。遺伝子のタイピングは、肝組織より抽出した DNA を用いて、UGT1A1 については -3279T>G (*60)、-3156G>A、-40_-39insTA (共に*28)及び 211G>A (*6)を、UGT1A 分子種の共通 3'-UTR については 1813C>T、1941C>G 及び 2042C>G (共に*1B)を、UGT1A9 については -126_-118T9>T10 (*22)を、また、UGT2B7 については -327G>A、-161C>T 及び -125T>C を、シーケンス法により行った。mRNA の発現量解析では、Exp 1 においては、16 検体の肝組織を用いて RNAqueous samll scale phenol-free total RNA Isolation kit (Ambion, Austin, TX) を使用して、また、Exp 2 においては、14 検体の肝組織を用いて mirVana miRNA Isolation kit (Ambion, Austin, TX) を使用して Total RNA 画分を調製した後、UGT1A1、UGT1A9 及び UGT2B7 の mRNA 発現量を、GAPDH の発現量をコントロールとして、リアルタイム RT-PCR 法で測定した。

3) ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針との関係

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づいて、国立衛研の倫理委員会より承認を得て実施した。

3. トランスポーター

1) OCT1, OCT2 遺伝子多型とメトホルミン治療効果との関連解明

遺伝子情報が不足していたため、日本人 DNA を用いた多型解析を実施した。次に、臨床効果との関連評価で、メトホルミンに良好に反応した 24 名、反応が見られなかった糖尿病患者 9 名を対象として、効果に関与する要因の絞り込みを行った。さらに、要因として選択された遺伝子変異の影響をヒト肝に発現する OCT1mRNA 量で評価した。

2) SLCO1B1, BCRP 遺伝子多型とピタバスタチン体内動態関連

SLCO1B1, BCRP 遺伝子多型の機能評価を目的にピタバスタチン 2 mg を両遺伝子の遺伝子型が既知の 38 名のボランティアに投与し、体内動態比較を行った。

3) SLCO1B1 および MRP2 遺伝子多型の臨床評価

対象患者：(CPT-11 study)塩酸イリノテカン (CPT-11)を投与中、重篤な血液障害を認めた 61 歳の男性患者。コントロール群としては、同様なプロトコールによる抗がん剤の投与を受け、重篤な副作用を見ることの無かった患者 10 名。(MRP2 study) Dubin-Johnson 症候群(DJS)が疑われる 76 歳の女性患者。患者の特徴として、収縮性心外膜炎による鬱血肝を合併してビリルビン値が 40mg/dl 以上まで上昇したことなどが挙げられる。採血：CPT-11 点滴静注開始、0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8, 12, 24 時間目に採血を行った。遺伝子多型の検索：CPT-11 については、SLCO1B1*15, *1b に加え、UGT1A1*28, *60, *6 について Taq-Man primer & probe を用いた遺伝子診断を実施した。MRP2 解析については、遺伝子全領域について full screening を行い、塩基配列をシーケンスにより決定した。血中濃度測定：イリノテカン、代謝物 SN-38、グルクロン酸抱合体(SN-38G)の血中濃度は、高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

4) 倫理面への配慮

遺伝子解析に使用した DNA は連結不可能匿名化された試料であり、本研究の目的等、倫理指針に準拠した説明を行い、書面による承諾を得た後に使用した。さらに、総ての研究は、関連研究機関総てのゲノム倫理審査委員会で、審査・承認を受けた後実施した。

4. CYP を中心とした薬物動態関連遺伝子

1) CYP3A4 と SLCO1B1

CYP3A4 及び SLCO1B1 については、日本人と白色人種及びヒスパニック（メキシコ系アメリカ人）の肝組織を用い、SLCO1B1 及び CYP3A mRNA 発現量をこれらの人種間で比較した。

2) リバピリントランスポーター

ヒト肝臓における核酸トランスポーターの発現は RT-PCR 法により検討した。ヒト遊離肝細胞および核酸トランスポーター特異的阻害剤を用いて、Na⁺存在下または非存在下での [³H]-ribavirin の肝細胞内への輸送活性に対する阻害効果を測定した。日本人肝検体 (n=18) より cDNA を調製し、SLC29A1 遺伝子発現量を real-time PCR 法により定量した。日本人肝臓における hENT1 タンパク発現量は western blot 法により定量した。

3) CYP1A2 の人種差と epigenetics

白人種及び日本人肝検体を用いて CYP1A2 活性に人種差が存在するか否かの検討と CYP1A2 の遺伝子発現にプロモーター部位のメチル化が関わっているか否かの検討を行った。

C. 研究結果 (トランスポーターについては結果及び考察)

1. ワルファリンの薬効発現関連遺伝子に関する検討

3人種の CYP2C9 活性低下に関連する変異アレルの頻度は、CYP2C9*2 および CYP2C9*3 について、黒人、白人、日本人 (アジア) にて 0%, 14.3%, 0% および 0.8%, 10.9%, 1.6% であった。この結果から、CYP2C9*2 および *3 アレルは白人集団における S 体ワルファリンの体内動態の個人差に大きな影響を持つが、黒人とアジア人においては集団内での動態変動には寄与が少ないことが判明した。一方、ビタミン K エポキシド還元酵素 (VKORC1) の遺伝多型 (1173 C>T) の変異頻度は、アジア人、白人、黒人の順に高く、89%, 42%, 8.6% であった。この変異の存在は、VKORC1 のワルファリン感受性の増加に関連するアレルであることから、この変異のワルファリン投与量の個人差への影響は、アジア人、白人、黒人の順で高いことが予測された。

更に、ワルファリン投与量の個人差に関係する臨床的な要因として、従来から報告されている年齢、体重も考慮した上で、3人種から得られたデータを統合的に多変量解析すると、ワルファリン投与量の個人間変動に対する関与は、CYP2C9 多型と VKORC1 が同程度

に重要であることが判明した。ただし、これらの機能分子変異の頻度は人種により異なり、白人は双方の変異を他の2人種よりも高頻度に保有しているためこれらの機能分子のジェノタイプは白人で特にワルファリン投与量の個人差を事前に察知する上で意義があると考えられた。

一方、ワルファリン光学異性体の代謝には異なる CYP 分子種が関係する。S 体ワルファリンについては CYP2C9 であり、R 体ワルファリンについては主として CYP1A2 である。これら分子種の活性には両者の間には非誘導時およびリファンピシン併用による活性誘導時において強い相関が観察された。この結果は両分子種の発現に共通の環境因子あるいは発現調節分子に共通の遺伝要因が存在することを示唆している。これらの分子種の発現調節には共通して PGC1 α (peroxisomal proliferator activated receptor γ -coactivator 1 α) とその coactivator である HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) が関係するため、予備的に 31 種の既知の多型について検討したが CYP2C9 活性の個人差に関係する変異は見いだせなかった。

2. グルクロン酸転位酵素分子種に関する検討

1) UGT1A4 の遺伝子多型頻度と人種差

256 人の被験者からは、11 箇所の新規多型を含む 19 箇所の多型を検出した。エクソン部分の新規多型のうち、2 箇所の SNP、SNP、271C>T (R91C) 及び 325A>G (R109G) はアミノ酸変異及びを伴い、2 箇所の SNP、127delA (43fsX22) 及び 175delG (59fsX6) はフレームシフトを生じてストップコドンが発生する変異であったが、いずれも頻度は非常に低かった。また、同じく頻度は低い、イントロン 1 のスプライス・ドナー部分の SNP (IVS1+1G>T) も検出された。白人において検出されている SNP、70C>A (P24T) は、今回検出されなかった。アミノ酸変異を伴う既知の SNP、R11W 及び L48V は検出され、それぞれ頻度は 0.012 と 0.129 であった。これらの SNP は、グルクロン酸抱合能が全くないか変化する可能性が考えられたが、いずれも頻度が非常に低いために、日本人における UGT1A4 によるグルクロン酸抱合の変動の原因となるとは考えられなかった。L48V は、ドイツ人の頻度に匹敵していたが、フロリダ州のがん患者の L48V の頻度よりは高かった。また、ドイツ人では P24T と L48V には強度

の連鎖が観察されているが、日本人における連鎖は弱かった。以上より、P24TとL48Vの発現頻度、及び、UGT1A4のハプロタイプには、人種差が存在すると結論づけられる。

2) UGT1A1 遺伝子多型と総血中ビリルビン濃度

*60, *28, *6のタイピング結果から、各被験者のBlock 1のディプロタイプを決定した。すなわち、Block1のハプロタイプ#1は、いずれの変異も有しないアレルとし、ハプロタイプ#6は*6のみを有するアレル、#28は*60と*28を同時に有するアレル、及び、#60は*60のみを有するアレルとした。一方、Block 2については、*IBのタイピングの結果から、ハプロタイプ#1Aは*IBを有しないアレルとし、#1Bは同変異を有するアレルとし、各被験者のディプロタイプを決定した。さらに、UGT1A1の2つのブロックのコンビネーション・ハプロタイプを推定した。

これらのコンビネーション・ハプロタイプと血中総ビリルビンとの関連を検討した。Dunnet multiple comparisonによる解析結果から、#1-#1A/#1-#1A群に比較して#6-#1A/#28-#1A群 ($p<0.0001$)、#6-#1A/#6-#1A群 ($p<0.0001$)、#6-#1A/#60-#1B群 ($p<0.0133$)、#60-#1A/#28-#1A群 ($p<0.0186$)、及び、#28-#1A/#28-#1A群 ($p<0.0213$)で、有意に血中総ビリルビン濃度が高かった。#6-#1A群及び#28-#1A群による血中総ビリルビン濃度の有意な増加は、#6及び#28によって血中総ビリルビン濃度が有意に増加するという、Kaplanらの報告と一致していた。

次に、#IBと#60が同一の染色体上にある場合の血中総ビリルビン濃度に及ぼす影響を検討するために、#60-#IB及び#60-#1Aの#28-#1A又は#6-#1Aに対する相加効果の影響を検討した。#1-#1A/#28-#1A群又は#1-#1A/#6-#1A群に対して、#60-#IB/#28-#1A群又は#60-#IB/#6-#1A群の血中総ビリルビン濃度のメディアンの上昇の程度は、#60-#1A/#28-#1A群又は#60-#1A/#6-#1A群の血中総ビリルビン濃度のメディアンの上昇の程度に比較して大きかった。特に#1-#1A/#6-#1A群と#60-#IB/#6-#1A群の血中総ビリルビン濃度の差は統計的に有意であった ($p=0.0093$)。また、被験者数が少なく、統計的には有意とはならなかったが、#60-#IB/#60-#IBの血中総ビリルビン濃度のメディアンは、#1-#1A/#1-#1A群、#1-#1A/#60-#1A群、#60-#1A/#60-#1A群よりも高かった。なお、

#28又は#6と組まない#60-#1Bのヘテロ接合体では、血中総ビリルビン濃度の上昇は認められなかった。

3) ヒト肝組織を用いた UGT1A9 及び UGT2B7 のプロモーター領域の変異、並びに、UGT1As の転写調節領域と 3' UTR 領域の変異と mRNA の発現量との関連

ヒト肝組織の入手時期に応じてRNA画分の抽出を2回に分けて行ったが、mRNA内在性コントロールのGAPDHの発現量に対するUGTのmRNAの発現量の平均値及び標準偏差が、Exp1とExp2の間で大きく異なっており、両結果を合わせて解析することは不適切と考えられたので、別々に解析することにした。

UGT1A1については、Exp1では、転写活性が低下することが知られている*28のヘテロ接合体では、mRNAの発現量の平均値は*1のホモ接合体の平均値の約1/4であった。一方、*28と互いにヘテロ接合している検体を除き、*6を有する検体のmRNA発現量の平均値は*1のホモ接合体の平均値と大きな差はなかった。*60を有する検体はExp2で3検体あったが、その内の1検体は3'UTRに*IBを有する*60-#IBのホモ接合体であった。この検体のmRNA相対レベルは、*1/*1に比較して低いということではなかった。

UGT1A1については、*28では転写活性が低下し、一方、*6では発現したタンパクの酵素活性が低下することが、広く知られている。今回の日本人の肝組織を用いたmRNAの発現量に関する結果は、ばらつきが大きいものの、これまで得られている知見と特に矛盾するものではなかった。一方、エンハンサー領域のSNP*60と3'UTRの連鎖したSNP*IBが同一染色体上に存在する場合には、ビリルビンのグルクロン酸抱合が相加的に低下することについては、今回のサンプルの中に、*60-#IBをホモ接合体で有する検体が1例あったものの、そのUGT1A1のmRNA発現レベルは低くはなかったため、*60-#IBの活性が低下する原因を解明することはできなかった。

UGT1A9では、いずれのExpにおいても、プロモーター領域の対立遺伝子では、T9よりもT10を多く保有する場合に発現量が増える傾向が認められたが、いずれのExpにおいても統計的な有意差は検出されなかった。

UGT2B7の-125T>Cについては、両EXPにおいて、ばらつきが大きく一定の傾向が認められなかった。

3. トランスポーター

1) *OCT1*, *OCT2* 遺伝子多型とメトホルミンの治療効果との関連解明

遺伝子解析の結果、*OCT1* に 11 種類、*OCT2* に 2 種類の変異を確認した。そのうち、5/11、2/2 が non-synonymous 変異でアミノ酸の置換を伴っていた。メトホルミンに対する responders (n=24) と non-responders (n=9) を判別する要因を検討した結果、年齢、BMI、高脂血症治療の有無、408Met>Val (exon 7) が positive 要因、-43T>G (intron 1) が negative 要因として選択され、判別精度は 55.5%であった。そこで、ヒト肝を試料として、*OCT1*mRNA 発現量を 408Met>Val 変異の有無で比較した結果、408Met で発現量の低下が観察された。今回の検討では、人種差の検討は行わず、日本人での薬効に関与する遺伝子変異の選定を重点的に実施した。メトホルミン血糖降下作用には、以前より non-responders の存在が知られており、肝抵抗性を示すとの認識が臨床医にあったことから、本検討を着手した。41Phe>Leu, 117Pro>Leu, 160Phe>Leu, 341Pro>Leu, 408Met>Val の有無で層別したヒト肝を試料として、*OCT1*mRNA 発現量との関連を評価した。その結果、408Met を有することで、発現量の低下が見られた。患者データの解析結果では、408Met 型で効果の減少が示唆されており、この背景には、408Met 型患者では、メトホルミン肝取り込みに関与する *OCT1* 発現量が低下し、メトホルミンの標的臓器の 1 つである肝への移行が減少することで、効果が減弱することが想定された。

2) *SLCO1B1*, *BCRP* 遺伝子多型とピタバスタチン体内動態関連

SLCO1B1 遺伝子多型との関連については、pravastatin 同様に*15 allele があることで、血中濃度の上昇が観察された。一方、*BCRP* 421C>A に注目した場合、421C/C*1b/*1b (n=11)、421C/A*1b/*1b (n=7)、421A/A*1b/*1b (n=3)群でのピタバスタチン AUC には差は見られなかった。ピタバスタチンの体内動態に *BCRP* 遺伝子多型の関与は認められなかった。しかし、同じ HMGCo-A 還元酵素阻害剤であるロスバスタチンでは多型の関与が報告されている。421C/C タイプで有意に低い AUC 値を示す。*BCRP* 多型研究者の最近の報告などを通して、*BCRP* 遺伝子多型の意義は基質薬物に依存することが指摘されている。現在、我々の研究室では、抗リウマチ薬の体内動態と *BCRP* 多型との関与を検討中であるが、421C/C タイプでは、F (bioavailability)が A/A タイプに比べ、

2.5 倍程度高値を示す結果が得られている。基質薬物依存性が示唆される。

3) *SLCO1B1* および *MRP2* 遺伝子多型の臨床評価 ; (CPT-11 study)

症例患者の CPT-11, SN-38, SN-38G の AUC はそれぞれ、4553.3, 260.7, 864,4 ng hr/mL であった。投与量で補正した値に換算し、コントロール群と比較すると、本患者の CPT-11, SN-38 の AUC は、それぞれ 43%、87%高値であった。

UGT1A1 の遺伝子診断では、代謝活性の低下の原因となり、日本人で見られる変異である*6, *28, *60 について行った。特に、*28 変異では、重篤な下痢との関連が知られており、重要な変異となる。本症例患者には、いずれの変異も認められず、総ての箇所野生型のホモ接合型であった。一方、コントロール群では、*60/*60 型が 2 名、*28 変異のヘテロ型が 3 名、*6 のヘテロ型が 2 名認められた。SN-38G の血中濃度は症例患者で高かったが、*UGT1A1* 変異が原因ではないと考えられる。

最近の in vitro 研究の知見に基づき、*SLCO1B1* 遺伝子多型の関与を検討した。症例患者は *SLCO1B1**15 変異のホモ接合型であった。一方、コントロール群では、*15 変異のヘテロ型が 5 名に見られた。*15 変異は、日本人では、約 16%の頻度で見られる変異であるが、ホモ接合型は 0.8%前後と少ない。*15 変異の機能への影響は、主にスタチンでよく研究されており、輸送能が極めて低下する。症例患者では血中濃度の上昇が見られたが、肝取り込み能が低下する結果、中心静脈への移行量が増加し、血中濃度が上昇したものと推定される。*15 変異のヘテロ接合型では、血中濃度上昇は見られないことから、ホモ接合型に注意が必要と考えられる。

5) *MRP2* 遺伝子解析

当初、DJS の既知の原因遺伝子変異を網羅的に探索したが、認められなかった。新規の変異が予想されたことから、探索範囲を全領域に拡大した。exon 7 が増幅されなかったことから、本領域を中心に解析を行った結果、exon 7 を含む 1.2 kb の欠損が確認された。従来知られる DJS の原因変異は、一塩基置換が主であり、これほど大きな変異の報告は皆無である。exon 7 の欠損であることから、輸送機能は完全に喪失すると思われ、本欠損が DJS の原因と特定された。

4. CYP を中心とした薬物動態関連遺伝子

1) CYP3A4 と *SLCO1B1*

今回検討を行った3人種間においては、SLCO1B1 mRNA 発現量に大きな個人差が存在するものの、人種間には大きな差異は認められないことが明らかとなった。個人差の原因として-11187G>AのSLCO1B1 mRNA 発現量に対する影響を比較したが、白人種日本人いずれにおいてもSNP保有者(heterozygote)と非保有者(wild typeのhomozygote)間では、SLCO1B1 mRNA 発現量への有意な差は認められなかった。一方、CYP3A4 mRNAについては、検討を行った3人種間で平均値に大きな差が認められ、白人種>日本人>ヒスパニックの順で発現量の平均値が大きかった。これらの人種差には発現量の低い検体の割合が反映されている傾向が認められた。

2) リバピリントランスポーター

ヒト遊離肝細胞を用いて、hENT1阻害剤であるNBMPRおよびhENT2阻害剤であるhypoxanthineのNa⁺存在下およびNa⁺非存在下におけるリバピリンの輸送活性阻害を検討した結果、全リバピリン取り込みに対するNa⁺-dependent、Na⁺-independent NBMPR sensitive、Na⁺-independent hypoxanthine sensitive および Na⁺-independent NBMPR insensitiveの相対寄与率の平均は、0%、30.0%、0%および70.0%であった。これらの結果より、Na⁺-independent NBMPR sensitive画分に相当するhENT1がリバピリンの肝取り込みに大きく寄与していることが明らかとなった。次に日本人肝検体(n=18)のhENT1 mRNA 発現量を測定したところ、検体間で約5.6倍の差が認められた。また、日本人肝検体(n=10)から膜画分を調製し、hENT1タンパク発現量の個人差を検討した結果、検体間で約2.9倍の差が認められた。

3) CYP1A2の人種差とepigenetics

日本人非喫煙者肝ミクロソームにおけるEROD活性は白人種よりも1.7倍高い値を示したが、これらの間に有意な差は認められなかった。一方、HepG2細胞におけるCYP1A2 mRNA 発現量はCpG配列メチル化阻害剤である5'-aza-dC処理により大きく上昇した。また、ルシフェラーゼレポーターシステムを用いて転写開始点近くのGC-boxの機能解析をおこなったところ、GC-boxを含むCYP1A2プロモーターは高い転写活性化能を示した。このGC-boxにはSp1およびSp3結合が認められ、CYP1A2が発現しているヒト細胞ではこの部位が80%非メチル化状態であったのに対し、発現していないHeLa細胞では完全にメチル化

されていた。さらに、*in vitro*メチル化レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ、GC-box内CpG配列のメチル化はCYP1A2プロモーター活性を大きく減少させた。

D.考察

1. ワルファリンの薬効発現関連遺伝子に関する検討

これまでの成果により、CYP2C9の白人、黒人、アジア人の変異アレルとそれらの頻度が明らかにされた。また、近年他の研究者によりワルファリンの標的分子であるVKORC1の1173 C>T変異がワルファリン感受性の個人差に重要な関与をもつことも明らかとなった。そこで、今年度は、これらの両機能分子の変異アレルが持つワルファリンの投与量の個人間変動に対する意義付けを、従来から指摘されているワルファリン投与量の個人差因子である年齢、体重も含めて検討した。

3人種のデータを個別に評価すると、ワルファリン投与量の人種差に関しては、VKORC1の1173 C>T変異の頻度がアジア人(日本人)には極めて高く、日本人のほぼ90%はワルファリン感受性を高める変異アレルを有することが判明した。この結果は、アジア人のワルファリン平均投与量が3mg/日と白人や黒人の6mg/日より低いことを良く説明する結果であった。一方、アジア人におけるCYP2C9の活性低下に関係する変異アレル頻度は他の2人種よりも低いため、ワルファリン投与量の人種差を説明するものではないことも明らかとなった。このデータは、CYP2C9により主として代謝される医薬品投与量の人種差を考察する上で興味深い結果であった。

それでは、各人種内でのワルファリン投与量の変動に対するCYP2C9とVKORC1の影響を考察すると、日本人では90%がVKORC1の1173 C>T変異を有し、CYP2C9の変異アレルの頻度も低いため、これら2種類の機能分子のpharmacogenomics情報をワルファリン投与量の予測に用いる意義は最も低い人種であった。白人は、CYP2C9とVKORC1ともに変異アレル頻度が50%前後であるため、これらの分子種のpharmacogenomics情報を投与量予測に使用する意義が高い人種であると言える。最後に黒人では、CYP2C9とVKORC1多型の変異アレル頻度はともに低いため、日本人と同様にこれらの分子種のpharmacogenomics情報を投与量予測に応用する可能性は低いと思われる。日本人と黒人におけるCYP2C9およ

び VKORC1 pharmacogenomics 情報の応用は過剰な抗凝固効果発現患者の原因解明であると考える。結論として、pharmacogenomics 情報の臨床応用は1人種からのデータでは結論をつけることが出来ず、薬効変動に関係する動態および感受性分子の変異アレルの人種差を考慮して、複数人種のデータを統合的に解析する必要があることが確認された。年齢、体重の両因子は3人種から得られたデータに基づいて検討しても独立して有意な変動因子であった。

日本人を初めとするアジア人には CYP2C9 の構造領域の変異頻度は白人より遙かに低いにも関わらず活性には白人と同程度の個人間変動が観察される。これまでの 5' 上流領域の多型検索では発現調節の個人差に関するアレルは発見されていない。最終年度の検討から同一人では CYP2C9 と CYP1A2 がそれぞれ主に関係する S 体ワルファリンと R 体ワルファリンの活性には良い相関が観察されたため、この結果は、発現調節に関わる核内因子やその coactivator 分子などの多型を検討する必要があることを示唆している。最終年度では予備的な検討しか行えなかったため責任アレルは見いだせなかったが、今後より広範な検討が望まれるものと考えた。

2. UGT1A4 の遺伝子多型頻度と人種差

鹿庭らは既に、日本人において UGT1A1 の活性を低下させる遺伝子多型を考慮する場合には、白人種、黒人種とは異なり、*28 の他に、*6 を考慮しなければいけないことを明らかにしてきた。本年度の、血中総ビリルビン濃度との関連解析に解いても、日本人においては、*28 及び *6 の多型が、UGT1A1 の活性低下と関連があることが確認できた。また、我々は、*1B が、血中総ビリルビン濃度の上昇と関連があることを報告したが、今回の検討で、*1B と *60 が、同一の染色体上にあるときに、その効果が著しいことが確認できた。

UGT1A9 については、プロモーター領域の T の繰り返し数が多い変異(*22)では、*in vitro* の転写活性が野生型に比較し約 2.6 倍高くなることが報告されているが、mRNA 発現レベルや酵素活性は両者で差がないという報告と有意に上昇するという報告がある。今回のサンプルでは、ばらつきが大きく有意差は検出されなかったが、mRNA 発現量は、T9 に比較し T10 で上昇する傾向が認められ、基質によってはグルクロン酸抱合能が上昇するという報告との関連が示唆された。この変異の日本

人における頻度は、白人や黒人の頻度に比較して高い。

3. CYP を中心とした薬物動態関連遺伝子

1) CYP3A4 と SLCO1B1

今回の検討により、SLCO mRNA の発現にはその発現量を減少させる、または上昇させる複数の因子が存在し、そのために SLCO1B1 mRNA 発現量に大きな個人差を生じる可能性があることが明らかとなった。mRNA の発現量において個人差が生じる原因には、遺伝子多型、加齢、性差など様々な要因が考えられるが、これまでに SLCO1B1 において複数の遺伝子多型が存在することが報告されており、SLCO1B1 遺伝子 5' 上流領域に SNP -11187G>A が存在することが報告されている。この SNP を含む SLCO1B1 haplotype のひとつとして *17 が報告されており、この *17 の保有者では pravastatin の area under the plasma concentration curve が非保有者に比べ大きく上昇するとの報告がある。Pravastatin の体内動態には OATP1B1 が大きく寄与することが報告されていることから、SNP (-11187G>A) が OATP1B1 の機能や発現量に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

しかしながら、今回の結果は -11187G>A が SLCO1B1 mRNA 発現量へ与える影響はほとんどないことを示しており、この SNP が mRNA 発現量の個人差の原因となっている可能性は少ないものと考えられた。

一方、CYP3A4 mRNA については、白人種において CYP3A4 mRNA 発現量の低い検体が全体の半分以上を占めており、平均値を下げた結果となっていた。実際、これら 3 人種間における CYP3A4 mRNA 発現量の平均値はそれぞれ $1.8 \pm 3.1, 4.1 \pm 2.9, 7.1 \pm 7.7$ (normalized values by internal standard) であり、発現量の低い検体の割合が平均値の人種差に反映されているものと考えられた。今後 CYP3A4 mRNA 発現量の低い検体はどのような要因を持つ検体であるかについて明らかにすることが人種差の原因解明につながるものと考えられた。

3) CYP1A2 の人種差と epigenetics

本研究において HepG2 細胞における CYP1A2 mRNA 発現量は CpG 配列メチル化阻害剤である 5'-aza-dC 処理により大きく上昇したことから、CpG 配列のメチル化は CYP1A2 遺伝子発現に重要な役割を担っていると考えられた。

これまでに 5'-aza-dC 処理により発現量の上昇が認められる遺伝子の多くは CpG アイラン

ドの脱メチル化が関与すると考えられている。しかしながら、CYP1A2 遺伝子の近傍には CpG アイランドが存在しない。したがって散在する CpG 配列のいずれかが CYP1A2 遺伝子発現に関与すると考えられる。これら散在する CpG 配列のうちの一つは転写開始点近傍にある GC-box 内に存在している。GC-box は Sp family member の認識配列であり、本研究の結果においても、GC-box に変異を導入した場合 CYP1A2 のプロモーター活性は大きく減弱すること、CYP1A2 遺伝子の GC-box に Sp1 および Sp3 結合が認められたことから、CYP1A2 遺伝子の GC-box は CYP1A2 遺伝子の転写に大きく寄与していると考えられた。

さらに、ヒト肝組織及び HepG2 細胞では CYP1A2 の GC-box 内の CpG 配列は非メチル化されていたのに対し、HeLa 細胞では CYP1A2 の GC-box はメチル化されていた。このことは、ヒト肝細胞で CYP1A2 が発現しているのに対し、HeLa 細胞では発現していないことと良く一致する。また、*In vitro* メチル化レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイの結果からも、GC-box 内 CpG 配列のメチル化は CYP1A2 プロモーター活性を大きく減少させることが示されており、以上の結果を考え合わせると、CYP1A2 遺伝子発現に GC-box 内の CpG 配列のメチル化は重要な役割を担っていると考えられた。

E. 結論

1) アジア人のワルファリン投与量(約 3.0mg/日)が白人の平均値(約 5.0mg/日)と比較して約 50%低い人種差の原因は、ワルファリンの活性異性体である S 体ワルファリンの代謝に関わる CYP2C9 の遺伝多型の人種差と言うよりも、むしろ主要なワルファリン作用蛋白である VKORC1 の遺伝多型が原因である。

2) ワルファリンの光学異性体特異的および部位特異的な代謝クリアランスの個人間変動は CYP2C9 の多型によらず有意な相関を示すことから、これらの代謝に関わる CYP 分子種 (CYP2C9 と CYP1A2) の活性調節機構に共通の因子が関与していることが示唆された。

3) 日本人において UGT1A1 の活性が低下する原因多型として、白人や黒人における原因多型である *28 以外に *6 も考慮にいれなければならない。

4) UGT1A4 の遺伝子多型、UGT1A9 のプロモーター領域の遺伝子多型、及び、UGT2B7 のプロモーター領域の遺伝子多型の頻度の人種差の臨床的意義については、今後更に検

討が必要である。

5) OCTs の 408Met>Val (1222A>G) A 型保有者は、ヒト肝での mRNA 発現量が低下することから、メトホルミンの効果が減弱するものと考えられた。

6) BCRP 遺伝子多型の関与は基質薬物に依存することが示唆されており、その影響は吸収率に大きく作用することから、薬効への影響が注目される。

7) SLCO1B1*15 変異のホモ接合型はイリノテカンと SN-38 の体内動態に大きく影響し、肝取り込みが低下することにより生じる体内蓄積が重篤な副作用の原因となる。日本人の場合、ホモ型の頻度は 0.8%と低いが、適正使用のためには、事前の診断が望まれる。

8) DJS の原因遺伝子変異として、MRP2 遺伝子の 1.2 kb の exon 7 を含む大掛かりな欠損を特定した。本変異は、極めて希な変異であり、日常的に診断が必要な変異ではないと考えられる。

9) ヒト肝における CYP3A4 mRNA の発現量には、人種間で平均値に大きな差が認められ、白人種>日本人>ヒスパニックの順で発現量の平均値が大きい傾向を示した。

10) リバビリンの肝取り込みに大きく寄与する核酸トランスポーターは hENT1 であり、日本人肝検体における mRNA およびタンパク発現量には比較的大きな個人差が存在する。

11) CYP1A2 遺伝子転写開始点近傍に存在する GC-box は CYP1A2 遺伝子のプロモーター機能に重要な役割を担い、その内に存在する CpG 配列のメチル化は CYP1A2 遺伝子発現を調節するものと考えられる。今後このようなエピジェネティックな遺伝子発現調節機構が CYP1A2 遺伝子発現量の個人差や人種差とどのように関連するか検討する必要がある。

F. 研究発表 論文発表

Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K: Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1*5, SLCO1B1*15 and SLCO1B1*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. Pharmacogenet Genomics. 15:513-22, 2005

Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Hachisuka A, Kaniwa N et al. Drug Metab Pharmacokinet 20: 144-151, 2005

Ieiri I et al. Interaction magnitude, pharmacokinetics and pharmacodynamics of ticlopidine in relation to CYP2C19 genotypic status. *Pharmacogenet Genomics*, 2005;15: 851-9. 2006

Ieiri I et al. Genetic polymorphisms of drug transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy. *Expert Opinion*, 2006;2: 651-74.

Maeda K et al. Effects of organic anion transporting polypeptide 1B1 on pharmacokinetics of pravastatin, valsartan, and temocapril. *Clin Pharmacol Ther*, 2006;79: 427-39.

Shikata E et al. Multiple gene polymorphisms and warfarin sensitivity. *Eur J Clin Pharmacol*, 2006;62:881-3.

Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA, Morita T, Ritchie MD, Scordo MG, Pengo V, Barban M, Padrini R, Ieiri I, Otsubo K, Kashima T, Kimura S, Kijima S, Echizen H. Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. *Pharmacogenet Genomics*. 2006 16:101-110.

Takane H et al. Pharmacogenetic determinants of variability in lipid-lowering response to pravastatin therapy. *J Hum Genet*, 2006;51:822-6.

Shikata E et al. Human organic cation transporters (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin. *J Hum Genet*, 2007;52:117-22.

Takane H et al, Severe toxicities after irinotecan-based chemotherapy in a patient with lung cancer: a homozygote for the SLCO1B1*15 allele. *Ther Drug Monit*, 2007;29:666-8.

家入一郎、薬物トランスポーターと薬剤感受性(1)-薬物トランスポーター遺伝子多型の臨床的意義-、最新医学、2005;60: 1827-32

家入一郎、薬物トランスポーターと薬剤感受性(1)-薬物トランスポーター遺伝子多型の臨床的意義-、最新医学、2005;60: 1827-32

高橋晴美、Wilkinson GR、Nutescu EA、森田隆司、Scordo MG、Pengo V、Barban M、Padrini R、家入一郎、大坪健二、賀嶋俊隆、木村壮介、木島慎一、越前宏俊: 日本人、白

人、黒人患者のワルファリン投与量の個人差に及ぼすVKORC1とCYP2C9多型の影響 日本血栓止血学会誌、16:549, 2005.

越前宏俊: 個別化されたワルファリン両方への道: 日本血栓止血学会誌、17:430-433, 2006.

高橋晴美、越前宏俊: CYP2C9 遺伝子多型とワルファリン応答性の個人差・人種差、In 創薬動態-医薬品創製のための考え方と最新情報-、玉井郁巳ら編、日本薬物動態学会、東京、pp64-71, 2006.

鹿庭なほ子、佐井君江. 腫瘍内科、2007;1:513-519

II 学会発表

Ieiri I. Multiple gene polymorphisms. Asian symposium for pharmaceutical Science in JSPS. Fukuoka, 2006.

Ieiri I. Interactive session - Warfarin pharmacogenomics. The first FIP-APSTJ joint workshop on individualized medicine. Tokyo, 2006.

Miyajima A, Ohta Y, Matsumoto S, Furihata T, Chiba K. Epigenetic regulation of *CYP1A2* gene expression by GC box methylation. ISSX 2nd Asia Pacific Regional Meeting, Shanghai, China, 2008

家入一郎、臨床に役立つ添付文書の科学的な読み方とその活用-相互作用のデータソースを検証する-、医療薬学シンポジウム、大阪、2006.

橋詰 美里、降幡 知己、千葉 寛: MDCK細胞由来新規核酸取り込み欠損細胞は核酸トランスポーターの機能解析に有用である第21回日本薬物動態学会(東京) 2006年11月

降幡 知己、橋詰 美里、千葉 寛: 内因性核酸トランスポート活性を欠失したMardin-Darby Canine Kidney細胞(MDCK-NTD22)の確立とその有用性、第1回トランスporter研究会(東京)、2006年12月

家入一郎、多遺伝子多型情報に基づいた医薬品個別適正化使用-最近の動向と知見-、長崎、2007.

橋詰 美里、降幡 知己、福地 由希菜、千

千葉 寛：内因性核酸トランスポート活性を欠失したMardin-Darby Canine Kidney細胞 (MDCK-NTD22) の確立とその有用性、第127回日本薬学会年会 (富山)、2007年3月
宮嶋篤志、太田雪、降幡知巳、千葉 寛：エピジェネティクス研究を促進させる新規 CpG-free luciferase reporter. 日本薬学会第128年会、平成20年3月26-28日、横浜

宮嶋篤志、松本早矢香、降幡知巳、千葉 寛：GC box メチル化による CYP1A2 発現制御.

日本薬学会第128年会、平成20年3月26-28日、横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

H. 健康危険情報

なし

資料 1

総括研究報告書

薬効及び副作用発現の人種差に関わる遺伝子多型に関する研究

主任研究者：千葉 寛

千葉大学大学院・薬学研究院・教授

研究要旨

本研究の目的は日本人と白人種の肝組織パネルを用いた人種差の検討、薬物動態や薬効発現に関するフェノタイプが明らかな患者 DNA 試料を用いることにより、薬効や副作用発現に関わる遺伝子多型の人種差に関わる要因について明らかにしていくことである。平成19年度の研究成果は1) ワルファリンの光学異性体の非結合型代謝クリアランスは CYP2C9 の遺伝子多型の有無にかかわらず、白人種、日本人いずれの人種においても有意な相関を示すこと、2) 日本人で比較的頻度の高い遺伝子変異である UGT1A9*22 が UGT1A9mRNA の発現量を増加させる傾向があること、3) *SLCO1B1*15* が塩酸イリノテカンによる重篤な血液障害の原因となる可能性を明らかにしたこと、4) CYP1A2 の遺伝子発現に epigenetics(メチル化)が関わっている可能性を明らかにしたことである。

分担研究者

越前宏俊

明治薬科大学教授

鹿庭なほ子

国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部室長

家入一郎

九州大学大学院薬学研究院准教授

ど、多方面からの解析を加えることにより、薬物動態ばかりでなく、薬効及び副作用発現の人種差に関わる要因を明らかにすることを目的に検討を行っている。

具体的には、ワーファリンの薬効発現関連遺伝子を越前が、グルクロン酸転位酵素分子種を鹿庭が、トランスポーターの解析を家入が、CYP3A4等のCYPを中心とした薬物動態関連遺伝子を千葉が担当し、副作用及び薬効に人種差が生じる原因と遺伝子多型との関係について検討を行っている。

A. 研究目的

国外で得られた臨床試験の結果を国内で使用するためには医薬品の効果と安全性の人種による差異を考慮しなければならない。

本研究班では、日本人、黒人、白人種のゲノム試料に加え日本人と白人種の肝組織パネルを用いた人種差の検討、薬物動態や薬効発現に関するフェノタイプが明らかな患者DNA試料の検討な

B. 研究方法

ワルファリンの薬効発現関連遺伝子については、これまでの研究でCYP2C9の遺伝子型とワルファリン異性体の経口遊離形クリアランスが測定されている白人および日本人患者検体を用いて、CYP2C9、PGC1 α 、HNF4 α の遺伝多型との関係を検索した。また、ワルファリン異性体の7

位および6位の水酸化体への部分代謝クリアランスが測定された患者データについてはS体ワルファリンの7位水酸化反応とR体ワルファリンの6位水酸化反応の部分代謝クリアランスの相関についても検討した。更にワルファリン服用中にリファンピシンを投与された2名の患者についてはワルファリン光学異性体の6位および7位水酸化への部分代謝クリアランスの相関についても検討した。

グルクロン酸転位酵素については、ヒト肝組織を用いて、プロモーター領域や3' UTR領域の変異がUGT活性の人種差に及ぼす影響について検討を行った。

トランスポーターについては、塩酸イリノテカンを服用中に重篤な血液障害を認めた患者の*SLCO1B1*遺伝子および*UGT1A1*遺伝子多型の解析を実施し、副作用との関連について検討を行った。

CYPについては、白人種及び日本人肝検体を用いてCYP1A2活性に人種差が存在するか否かの検討とCYP1A2の遺伝子発現にepigeneticsが関わっているか否かの検討を行った。

C. 研究結果

1) ワルファリンの薬効発現関連遺伝子

白人集団においてはワルファリン異性体の個人間変動とPGC1 α およびHNF4 α の遺伝子多型の間には有意な相関は見いだせなかった。一方、日本人集団において、S体ワルファリンの7位水酸化反応とR体ワルファリンの6位水酸化反応の部分代謝クリアランスには高度の相関が見出された。さらに、日本人および白人から得られたデータをプールした集団でもワルファリン光学異性体の遊離形経ロクリアランスはCYP2C9の野生型、CYP2C9*2または*3のヘテロ接合体、これらの変異アレルのホモ接合体、いずれの群においても有意かつ高度な相関が認められた。さらに、2患者でリファンピシン投与に伴いワルファリン光学異性体の6位および7位水酸化への部分代謝クリアランスは著明に増加したが、S体ワルファリンおよびR体ワルファリンの7位と6位の水酸化代謝体への部分

代謝クリアランスの有意な相関は誘導後も維持されていた。

2) UGT

UGT1A1については、*28のヘテロ接合体が3検体あり、これらのmRNAの発現量の平均値は*1のホモ接合体の平均値の約1/4であった。一方、*6を有する検体は8検体あり、これらの発現量の平均値は*1のホモ接合体の平均値と大きな差は認められなかった。*60を有する検体は3検体あったが、その内の1検体は3' UTRに*IBを有する*60-*IBのホモ接合体であった。この検体のmRNA相対レベルは、*1/*1に比較して低いことはなかった。

UGT1A9のプロモーター領域の対立遺伝子では、T9よりもT10を多く保有する場合に発現量が増える傾向が認められたが、2群間の差の検定及び傾向検定において有意差は検出されなかった。

3) トランスポーター

対象患者は鳥取大学医学部附属病院内科に入院中の肺癌患者で、治療のために塩酸イリノテカンを投与中、重篤な血液障害を認めた61歳の男性患者で、*SLCO1B1*遺伝子多型の関与を検討したところ、症例患者の遺伝子型は*SLCO1B1**15変異のホモ接合体であった。一方、同院入院加療中で、同様な抗がん剤の投与を受け、重篤な副作用を見ることの無かった患者10名について*SLCO1B1*遺伝子多型を調べたところ、5名が*15のヘテロ型接合体であった。

4) CYP

日本人非喫煙者肝ミクロソームにおけるEROD活性は白人種よりも1.7倍高い値を示したが、これらに有意な差は認められなかった。一方、HepG2細胞におけるCYP1A2 mRNA発現量はCpG配列メチル化阻害剤である5'-aza-dC処理により大きく上昇した。また、ルシフェラーゼレポーターシステムを用いて転写開始点近くのGC-boxの機能解析をおこなったところ、GC-boxを含むCYP1A2プロモーターは高い転写活性化能を示した。このGC-box

には Sp1 および Sp3 結合が認められ、CYP1A2 が発現しているヒト細胞ではこの部位が 80% 非メチル化状態であったのに対し、発現していない HeLa 細胞では完全にメチル化されていた。さらに、*in vitro* メチル化レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ、GC-box 内 CpG 配列のメチル化は CYP1A2 プロモーター活性を大きく減少させた。

D. 考察

1) ワルファリンの薬効発現関連遺伝子

今年度の検討によりワルファリンの光学異性体特異的および部位特異的な代謝に関係する CYP2C9 と CYP1A2 の代謝活性の個人間変動は CYP2C9 の構造領域の多型によらず相関していることが判明した。この結果は、両分子種の活性調節機構に共通の因子が関与していることを示唆していると考えられる。

両分子種の発現調節にはいくつかの共通の核内受容体分子およびその coactivator が関係している。今年度の検討では、PGC1 α と HNF4 α を候補として検討したが、有意な相関は見いだせなかった。今後より広範な検討を加える必要があると考えられた。

2) UGT

*UGT1A1*28* では転写活性が低下し、*6 では発現したタンパクの酵素活性が低下することが広く知られている。今回の日本人の肝組織を用いた mRNA の発現量に関する結果は、ばらつきが大きいものの、*28 保有群では発現量が低下する傾向にあり、一方、*6 保有群では発現量は *1/*1 と同程度にあり、これまで得られている知見と矛盾するものではなかった。一方、筆者らは、*60 と *IB が同一染色体上に存在する場合には、ビリルビンのグルクロン酸抱合が相加的に低下することを報告している。今回のサンプルの中に、*60-*IB をホモ接合体で有する検体が 1 例あったが、その UGT1A1 の mRNA 発現レベルは低くなかったことから、*60-*IB の活性の低下の原因が転写活性の低下である可能性は示すことはできなかった。

UGT1A9 については、プロモーター領域の T の繰り返し数が多い変異(*22)では、*in vitro* の転写活性が野生型に比較し約 2.6 倍高くなることが報告されているが、mRNA 発現レベルや酵素活性は両者で差がないという報告がある。一方、基質に mycophenolic acid 及び propofol を用いた場合には、*22 のグルクロン酸抱合能が有意に上昇するという報告もある。今回のサンプルでは、ばらつきが大きく有意差は検出されなかったが、mRNA 発現量は、T9 に比較し T10 で上昇する傾向が認められ、基質によってはグルクロン酸抱合能が上昇するという報告との関連が示唆された。

3) トランスポーター

*SLCO1B1*15* は、日本人では、約 16% の頻度で見られる変異であるが、ホモ接合体は 0.8% 前後と少ない。*15 変異の機能への影響は、主にスタチンでよく研究されており、輸送能が極めて低下する。症例患者では血中濃度の上昇が見られたが、肝取り込み能が低下する結果、中心静脈への移行量が増加し、血中濃度が上昇したものと推定される。*15 変異のヘテロ接合体では、血中濃度上昇は見られないことから、特にホモ接合体に注意が必要と考えられる。

4) CYP

本研究において HepG2 細胞における CYP1A2 mRNA 発現量は CpG 配列メチル化阻害剤である 5'-aza-dC 処理により大きく上昇したことから、CpG 配列のメチル化は CYP1A2 遺伝子発現に重要な役割を担っていると考えられた。

これまでに 5'-aza-dC 処理により発現量の上昇が認められる遺伝子の多くは CpG アイランドの脱メチル化が関与すると考えられている。しかしながら、CYP1A2 遺伝子の近傍には CpG アイランドが存在しない。したがって散在する CpG 配列のいずれかが CYP1A2 遺伝子発現に関与すると考えられる。これら散在する CpG 配列のうちの一つは転写開始点近傍にある GC-box 内に存在している。GC-box は Sp family member の認識配列であり、本研究の結

果においても、GC-box に変異を導入した場合 CYP1A2 のプロモーター活性は大きく減弱すること、CYP1A2 遺伝子の GC-box に Sp1 および Sp3 結合が認められたことから、CYP1A2 遺伝子の GC-box は CYP1A2 遺伝子の転写に大きく寄与していると考えられた。

さらに、ヒト肝組織及び HepG2 細胞では CYP1A2 の GC-box 内の CpG 配列は非メチル化されていたのに対し、HeLa 細胞では CYP1A2 の GC-box はメチル化されていた。このことは、ヒト肝細胞で CYP1A2 が発現しているのに対し、HeLa 細胞では発現していないことと良く一致する。また、*In vitro* メチル化レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイの結果からも、GC-box 内 CpG 配列のメチル化は CYP1A2 プロモーター活性を大きく減少させることが示されており、以上の結果を考え合わせると、CYP1A2 遺伝子発現に GC-box 内の CpG 配列のメチル化は重要な役割を担っていると考えられた。

E. 結論

1) ワルファリンの光学異性体特異的および部位特異的な代謝クリアランスの個人間変動は CYP2C9 の多型によらず有意な相関を示すことから、これらの代謝に関わる CYP 分子種 (CYP2C9 と CYP1A2) の活性調節機構に共通の因子が関与していることが示唆された。

今年度、共通因子の候補として PGC1 α と HNF4 α を検討したが、有意な相関は得られなかった。今後より広範な検討を加える必要があると考えられた。

2) UGT1A9 の転写調節領域における T の繰り返し数の違いによる多型 *22 は、統計的には有意ではなかったが、mRNA の発現量に影響を及ぼす傾向が示唆された。この遺伝子多型がグルクロン酸抱合能の人種差に及ぼす影響については、Genotype の違いによる酵素活性の差の程度と人種間における頻度の差を考慮して、今後さらに検討する必要がある。

3) *SLCO1B1**15 変異のホモ接合型がイリノテカンと SN-38 の体内動態に大きく影響し、肝取り込みが低下することにより生じる体内蓄積が重篤な副作用の原因となることを示唆した初めての症例報告である。日本人の場合、ホモ型の頻度は 0.8% と低いが、適正使用のためには、事前の診断が望まれる。

4) 本研究では非喫煙者における日本人種と白人種肝ミクロソームにおける CYP1A2 活性には有意な人種差は認められなかった。今後、測定法や比較する肝臓の入手法をそろえた条件で比較する必要があるものと考えられた。しかし、同時に本研究の結果より CYP1A2 遺伝子転写開始点近傍に存在する GC-box は CYP1A2 遺伝子のプロモーター機能に重要な役割を担うことが明らかとなり、さらに GC-box 内に存在する CpG 配列のメチル化はその GC-box の機能を調節することにより CYP1A2 遺伝子発現を調節する可能性が強く示唆された。今後このようなエピジェネティックな遺伝子発現調節機構が CYP1A2 遺伝子発現量の個人差や人種差とどのように関連するか検討する必要があると考えられる。

F. 研究発表

論文発表

Takane H, Miyata M, Burioka N, Kurai J, Fukuoka Y, Suyama H, Shigeoka Y, Otsubo K, Ieiri I, Shimizu E. Severe toxicities after irinotecan-based chemotherapy in a patient with lung cancer: a homozygote for the *SLCO1B1**15 allele. *Ther Drug Monit.* 2007;29:666-8.

鹿庭なほ子、佐井君江. SNP とテーラーメイド医療. *腫瘍内科*, 1(5), 513-519, 2007.

学会発表

宮嶋篤志、太田雪、降幡知巳、千葉 寛：エピジェネティクス研究を促進させる新規 CpG-free luciferase reporter. 日本薬学会第 128 年会、平成 20 年 3 月 26-28 日、横浜

宮嶋篤志、松本早矢香、降幡知巳、千葉 寛：GC box メチル化による CYP1A2 発現制御. 日本薬学会第 128 年会、平成 20 年 3 月 26-28 日、横浜

Miyajima A, Ohta Y, Matsumoto S, Furihata

T, Chiba K. Epigenetic regulation of *CYP1A2* gene expression by GC box methylation. ISSX 2nd Asia Pacific Regional Meeting, Shanghai, China, 2008

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

H. 健康危険情報

なし