

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

分担研究者 越前 宏俊 明治薬科大学 教授

研究要旨 医薬品の効果と副作用には遺伝的素因が深く関係している。そのため、新規医薬品データを人種間で相互利用するためには、その薬物の体内動態と感受性に関係する機能分子に関わる人種差の検討が重要である。特に、薬物動態に関連する機能分子である薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子多型情報は近年長足の進歩を遂げている。本年度の分担研究において、我々は肝薬物代謝酵素である CYP 分子種中でも CYP3A に次いで発現量の多い CYP2C ファミリー、特にその遺伝子多型の動態への影響と臨床的な意義付けが明確である、CYP2C9 の遺伝子多型について検討した。人種間では変異アレル頻度には大きな差異があり、遺伝情報の CYP2C9 基質薬物の効果の個人差への意義付けは人種により大きくことなることが判明した。白人では CYP2C9 のジェノタイピングは効果と副作用の予測に有用であるが、アジア人と黒人においては副作用原因の解明に主とした意義があると考えられる。

A. 研究目的

新規医薬品データを人種間で相互利用するためには、その薬物の体内動態と感受性に関係する機能分子に関わる人種差の検討が重要である。特に、薬物動態に関連する機能分子である薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子多型情報は近年長足の進歩を遂げている。諸外国における研究で得られた新規医薬品に関わる薬物動態および感受性のデータを我が国での臨床試験にブリッジングするためには、薬物動態に関連する機能分子である薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子多型情報が重要である。なかでもチトクローム P450(CYP)は多くの薬物の体内動態の個人差に関連するため、酵素の活性を左右する遺伝子多型の情報が有益となる。本研究では、我々は肝薬物代謝酵素である CYP 分子種中でも CYP3A に次いで発現量の多い CYP2C ファミリーの遺伝子多型を受け持ち、白人、黒人、アジア（日本）人、各 150 検体について検討を実施する事とした。

B. 研究方法

白人、黒人、アジア人サンプルに関して

は、協同入手した試料と国内で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。

今年度は、これまでの研究で明らかとなったアジア人、白人、黒人データを統合し CYP2C9 翻訳領域および 5'上流領域の多型を検討した。具体的には、CYP2C9*2 については、我々が従来から用いている PCR-制限酵素断片長多型(RFLP)法により判定し、CYP2C9*3、*4、*5、*11 は、変異部位が同一のエクソン7に存在するため、このエクソンのほぼ全長を PCR 法で増幅し、シークエンスにより同時解析をおこなった。更に、近年黒人が報告のあった、CYP2C9*6 変異については、Kiddes らの PCR-RFLP 法により解析したが、その際の陽性対照試料には Dr.Goldstein から好意にて提供された CYP2C9*6 試料を用いた。CYP2C9 の遺伝多型によるワルファリン投与量の個人間変動に対する寄与度は、3人種でワルファリンを抗凝固療法に服用していた患者から得られた試料の解析により行った。

C. 研究結果

3人種において現時点で既知のかつ比較的

頻度の高い変異アレルの検出により診断した野生型アレルの頻度は、黒人、白人、日本人（アジア）において、それぞれ 95.3%, 74.3%, 98.4%であった。また、CYP2C9*2 および CYP2C9*3 アレル頻度は、3人種でそれぞれ 0%, 14.3%, 0%および 0.8%, 10.9%, 1.6%であった。これらの薬物動態関連遺伝子変異の投与量の個人差に対する関与度は、他の変動要因である年齢、体重、ビタミン K エポキシド還元酵素(VKORC1)の遺伝多型(1173 C>T)とともに多変量解析を行った。その結果、CYP2C9 多型は全体として、VKORC1 の多型と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。

D. 考察

前年度までの検討により CYP2C9 の白人、黒人、アジア人の変異アレル種と頻度が明らかにされた。今年度は、これらの変異アレルの CYP2C9 基質薬物の代表である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検討した。

これまでの研究から、ワルファリンの投与量の個人差には年齢、体重、人種が関係していることが指摘されている。今年度の成果からも、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。加齢とワルファリン投与量との負の相関は、CYP2C9 の遺伝背景とは独立した酵素発現量の低下であると想定される。また、体重と投与量との関与については、体重が肝臓組織重量と正の相関を有するためと推定された。これらの因子と比較して CYP2C9 および VKORC1 の遺伝多型は 30-40% 前後より強い関与を有する因子であった。この結果は、ジェノタイプが投与量の個人

差を予測する上で demographic な因子より重要であることを示している。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。

E. 結論

白人、黒人、アジア（日本）人の3人種における CYP2C9 遺伝子の多型検索を通じて CYP2C9 基質薬物の応答性の個人差に関係する検討を行った。その結果、薬物動態関連の機能分子の応答性への関与は人種を問わず成立するが、その関与度は多型アレル存在頻度に依存して異なることも判明した。今後、薬物動態関連機能分子の多型研究成果の意義付けは人種差を考慮に入れてなされることにより、より意味のある成果が得られると期待される。

F. 健康被害状況

解析対象となる血液試料の収集は初年度で終了しており、以後に倫理上および健康上の被害はありませんでした。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

2.学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度の成果についてはありません。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価）

（分担）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

分担研究者 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

研究要旨 抗ヒスタミン剤やイミプラミンなどの抗うつ剤やアンドロゲン類などのグルクロン酸抱合を担っている UGT1A4 の遺伝子多型の人種間差を調べるために、日本人 256 人について、UGT1A4 の 5'上流域、エクソン1 及びイントロン部分の遺伝子多型を調べ、主たる多型について、文献で報告されている日本人以外の結果と比較した。

合計 19 箇所の変異が検出され、アミノ酸変異やフレームシフトを伴う新規の SNP も検出されたがいずれも頻度は低かった。欧米人において検出され、*in vitro* 実験で活性が変化すると報告されている P24T は、今回のサンプルからは検出されなかった。一方、同じく欧米人において検出され、*in vitro* 実験で活性が変化すると報告されている L48V は日本人においても検出され、そのアレル頻度は約 13%であった。この値はドイツ人における頻度とほぼ同程度であったが、フロリダ州のがん患者における頻度よりは高かった。なお、ドイツ人では P24T と L48V とは連鎖の程度が高いと報告されている。以上から、UGT1A4 の P24T と L48V の遺伝子多型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。

UGT1A4 の遺伝子多型における人種差の臨床的意義については、今後更に検討する必要がある。

A. 研究目的

医薬品の体内動態には人種差が存在することが知られている。そのため、医薬品開発のグローバル化が急速に進んでいる現在にあっても、新医薬品の承認審査において、国外で得られた臨床試験結果を、そのまま日本人における医薬品の有効性と安全性の根拠とすることはできない。ICH では、ある人種で得られた結果を他の人種に外挿するための bridging study を義務づけている。薬物の体内動態の人種差の要因のひとつに、代謝酵素やトランスポーターをコードする遺伝子における多型の種類と頻度の人種差

が上げられる。筆者は、平成 16 年度までの 3 年間で、厚生労働科学研究班「薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究」班の中で、グルクロン酸抱合に係わる UGT1A1 の遺伝子多型の人種差について検討し、グルクロン酸抱合により解毒化される薬物の人種間ブリッジングに際しては、UGT1A1*28 の他に UGT1A1*6 についても考慮しなければならないことを明らかにしてきた。

本年度より始まった「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」においては、筆者は、UGT1A1 以外の

グルクロニル転位酵素の分子種の遺伝子多型の種類と頻度を明らかにすると共に、肝組織を用いて、遺伝子多型の及ぼす影響について検討し、グルクロニル転位酵素の遺伝子多型が原因で生じる人種差について詳細に検討する予定である。

今年度は、ヒト肝組織の入手先の検討及び研究倫理申請の手続きを行った。また、*UGT1A4*の遺伝子多型の人種差を明らかにする目的で、日本人における*UGT1A4*の遺伝子多型の頻度を検討した。*UGT1A4*は、肝臓、胆管、小腸、大腸、膵臓に発現し、1-3)ニコチンやイミプラミンなどの外因性アミン類、アンドロゲン類やプロゲステロン類などの内因性物質のグルクロン酸抱合を担っている。1,4-7)

B. 研究方法

(1) 試料

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。

(2) 遺伝子のタイピング

UGT1A に属する分子種は 13 個の固有のエクソン 1 を有し (そのうち 4 個は偽遺伝子である)、エクソン 2~5 は全分子種間で共有されている。平成 16 年度までの厚生労働科学研究班「薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究」班において、エクソン 2~5 の主たる遺伝子多型については、既に、日本人、白人、黒人の 3 人種間における差を明らかにしてきた。そこで、今回は

UGT1A4 のエクソン 1 を中心に検討を行った。

1) 100 ng の DNA を、Table 1 に示した増幅用プライマー・セット 0.2 μ M、*Ex-Taq* (タカラバイオ株式会社、大津) 0.625 U を用いて、以下の PCR 条件で増幅させた。

94°C (5 min)	} 30 cycles
94°C (30 sec)	
55°C (1 min)	
72°C (2 min)	
72°C (7 min)	

PCR 産物を、PCR Product Pre-Sequencing Kit (USB Co., Cleveland, OH, USA) で処理し、両鎖を Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて、シーケンシングした。シーケンシング用プライマーは Table 1 に示した。測定は ABI Prism 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) で行った。

(4) 連鎖不平衡解析及びハプロタイプ解析
Hardy-Weinberg 平衡解析及び連鎖不平衡解析は SNPalyze ソフトウェア (Dynacom Co., 横浜) で行った。全ての座位がホモ接合の SNP の組み合わせ、又は、1 箇所のみがヘテロ接合の SNP を有する被験者から一義的に決まるハプロタイプを除いては、LDSUPPORT ソフトウェア⁸⁾ を用いてディプロタイプを推定した。

(5) 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実施された。患者の試料は連結可能匿名化された試料で、

対応表は外部の機関にあったので個人情報
が本研究から遺漏する恐れはなかった。健
康志願者については、連結不可能匿名化さ
れた試料である。本研究は、国立衛研の倫
理委員会が承認した範囲で行われた。

C. 研究結果

(1) 検出された遺伝子多型

Table 2 に、256 人の被験者から検出され
た 19 箇所の多型を示した。いずれの変異も、
Hardy-Weinberg 平衡解析が成立していた。
11 箇所の変異 (5' 上流域から 2 箇所、エク
ソン部分で 6 箇所、及び、イントロンで 3
箇所) は新規多型であった。エクソン部分
の新規多型のうち、2 箇所の SNP、
SNP271C>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
じる結果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、エクソン 1 に
続くイントロンのスプライス・ドナー部分
の SNP (IVS1+1G>T) も検出された。な
お、ドイツ人又はフロリダ州のがん患者で
検出されている SNP、^{9,10} 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。

(2) ハプロタイプ解析

検出された 19 個の遺伝子変異を用いて
ハプロタイプ解析を行った。1 名の被験者
を除いて 255 名の被験者では、0.9998 以上
の確度でディプロタイプを推定することが

できた。決定又は推定されたハプロタイプ
を Table 3 に示した。最もメジャーなハプ
ロタイプは *1a で頻度は 0.818、次に頻度の
高いハプロタイプは L48V を有する *3a で、
頻度は 0.123 であった。

D. 考察

今回、アミノ酸変異あるいはフレームシ
フトを伴う新規 SNP が検出された。フレー
ムシフトを伴う SNP を有する遺伝子から
は、おそらく活性のある酵素は生成されな
いと予測できるが、アミノ酸変異を伴う
SNP から生成する酵素の機能変化につい
ては不明である。しかし、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。

Mori らは、日本人 100 人について
UGT1A4 のエクソン 1 とイントロンの遺伝
子多型を調べた。¹¹ それによれば、L48V、
L150L、P268P 及び IVS 1+43 が検出され、
それらの頻度は今回の筆者らが報告した頻
度よりも少し高めであった (Table 2)。ま
た、Mori らも、日本人においては、P24T
は検出されなかったと報告している。Mori
らは、検出した 4 個の SNP を用いてハプ
ロタイプ解析を行ったが、筆者らの *1a に相
当するハプロタイプの頻度は 0.825、*3a 及
び *3b に相当するハプロタイプの頻度はそ
れぞれ 0.155 と 0.01、*1c に相当するハプ
ロタイプの頻度は 0.01 と報告しており、こ
れらは Table 3 に示す筆者らの報告に匹敵
している。このことより、UGT1A4 の日本
人におけるメジャーなハプロタイプは *1a
で (頻度 80% 強)、残る比較的メジャーなハ
プロタイプは *3a で頻度は 12~15% 程度で

あり、*1グループと*3グループの2つのハプロタイプのグループに日本人の約98%が含まれると推定できた。

UGT1A4では、アミノ酸変異を伴うSNPとしては、R11W、P24T及びL48Vの存在が報告されてきた(dbSNP-NCBI database、Table 2)。R11Wに関しては、本研究で観測された日本人における頻度は1%程度で、それ程高くはなかった。日本人以外の人種における頻度については報告がないが、恐らくそれ程高くはないと思われる。本研究及びMoriらの研究で、日本人では検出されなかったP24Tは、ドイツ人及びフロリダ州のがん患者ではアリル頻度は約8%程度と報告されている。⁹⁻¹⁰一方、L48Vは、ドイツ人の頻度は9.5%と報告されており、⁹今回観測された頻度12.9% (95%信頼区間0.100~0.158) とほぼ匹敵している。しかし、フロリダ州のがん患者のL48Vの頻度は2.6%と報告されており、¹⁰ドイツ人及び日本人よりはかなり頻度が低い。また、ドイツ人ではP24TとL48Vには強度の連鎖が観察された。⁹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。

現在までのところ、R11Wに関しては、機能変化の報告はない。P24T及びL48Vの機能変化に関する、Ehmerら、Wienerら、及び、Moriらの結果をTable 4に示した。Ehmerらによれば、UGT1A4をHEK293株に発現させた実験系では、野生型に比較し、 β -ナフチルアミン、trans-アンドロステロン、ジヒドロテストステロンに対する活性は低下し、ベンチジンに対しては活性が検出できなかった。⁹一方、Wienerらは、

ヒト肝ミクロソームを用いた4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-but anone (NNAL)のグルクロン酸抱合活性では、24Tの変異を有する場合は24P/24Pに比較して有意に活性が上昇したと異なる報告をしている。¹⁰UGT1A4をCOS-7株に発現させたMoriらの実験系では、tigogeninを除いては、L48Vも野生型に比較して活性が上昇すると報告している。¹⁰このように、これら2つのSNPの機能変化に関しては、研究者間で結果に不一致が見られるが、基質の違いによるものか、あるいは、実験系の違いによるものなのかは、今後の検討を待たなければならない。

筆者らは、今後、日本人の肝組織を用いてUGT1Asの遺伝子多型と活性との関連を明らかにしようとしている。その中で、UGT1A4のL48Vの活性も明らかになる可能性がある。

E. 結論

日本人256人について、UGT1A4の5'上流域、エクソン1及びイントロン部分の遺伝子多型を調べた。合計19箇所の変異が検出され、アミノ酸変異やフレームシフトを伴う新規のSNPも検出されたがいずれも頻度は低かった。*in vitro*実験で活性が変化すると報告されているP24TとL48Vのうち、前者は検出されなかった。L48Vの頻度は約13%で、この値はドイツ人における頻度とほぼ同程度であったが、フロリダ州のがん患者における頻度よりは高かった。明らかにこれらのSNPには人種差があると考えられる。

UGT1A4は、抗ヒスタミン剤やイミプラミンなどの抗うつ剤などのグルクロン酸抱

合を担っているが、現在のところこれらの薬物に対する P24T と L48V の臨床的意義については明らかにされていないので、これらの変異の人種間差の重要性については、今後更に検討する必要がある。

謝辞

本研究へご協力いただいた協力研究者の頭金正博博士、黒瀬光一博士、斎藤嘉朗博士、及び佐伯真弓研究員に深謝致します。

参考文献

- 1) Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:581-616.
- 2) Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics.* 1997;7(4):255-69.
- 3) Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH, Manns MP. Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem.* 2000;275(46):36164-71.
- 4) Green MD, Tephly TR. Glucuronidation of amines and

hydroxylated xenobiotics and endobiotics catalyzed by expressed human UGT1.4 protein. *Drug Metab Dispos.* 1996;24(3):356-63.

- 5) Nakajima M, Tanaka E, Kobayashi T, Ohashi N, Kume T, Yokoi T. Imipramine N-glucuronidation in human liver microsomes: biphasic kinetics and characterization of UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(6):636-42.
- 6) Nakajima M, Tanaka E, Kwon JT, Yokoi T. Characterization of nicotine and cotinine N-glucuronidations in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(12):1484-90.
- 7) Kaku T, Ogura K, Nishiyama T, Ohnuma T, Muro K, Hiratsuka A. Quaternary ammonium-linked glucuronidation of tamoxifen by human liver microsomes and UDP-glucuronosyltransferase 1A4. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(11):2093-102.
- 8) Kitamura Y, Moriguchi M, Kaneko H, Morisaki H, Morisaki T, Toyama K, and Kamatani N. Determination of probability distribution of diplotype configuration (diplotype distribution) for each subject from genotypic data using the EM algorithm. *Ann Hum Genet* 2002;66:183-193.
- 9) Ehmer U, Vogel A, Schutte J.K, Krone B, Manns MP, Strassburg CP. Variation of hepatic glucuronidation: Novel functional polymorphisms of the

UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4.
Hepatology, 2004;39: 970-977.

10) Wiener D, Fang JL, Dossett N, Lazarus P. Correlation between UDP-glucuronosyltransferase genotypes and

4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-but anone glucuronidation phenotype in human liver microsomes. Cancer Res. 2004;64(3):1190-6.

11) Mori A, Maruo Y, Iwai M, Sato H, Takeuchi Y.

UDP-glucuronosyltransferase 1A4 polymorphisms in a Japanese population and kinetics of clozapine glucuronidation. Drug Metab Dispos. 2005;33(5):672-5.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Saeki, Y. Saito, H. Jinno, K. Sai, A. Hachisuka, N. Kaniwa, S. Ozawa, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Shirao, H. Minami, A Ohtsu, T. Yoshida, N. Saijo, K. Komamura, T. Kotake, H. Morishita, S. Kamakura, M. Kitakaze, H. Tomoike and J. Sawada: Genetic variations and haplotypes of UGT1A4 in a Japanese population. Drug Metab. Pharmacokinet., 20, 144-151, 2005.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

Table 1. Primers utilized for *UGT1A4* amplification and sequencing

	Direction	Primer Name	Sequences	Location ^a
Amplification	forward	UGT1A4-1stF	TTAACAAAAGTAGAAGGCAGTG	135092
	reverse	UGT1A4-1stR	TGAAAACCTTGAAATACACTAGGC	136460
Sequencing	forward	UGT1A4-1stF	TTAACAAAAGTAGAAGGCAGTG	135092
	forward	UGT1A4seqF2	GGGCTGAGAGTGGAAAAGGT	145808
	forward	UGT1A4seqF3	TCCTTCCTCCTATATTCCTAAGTT	164388
	reverse	UGT1A4seqR1-2	ATCAAATTCCTTCTGGGTCC	135698
	reverse	UGT1A4seqR2	AAGGGCAGAAAAAGTATGG	136119
	reverse	UGT1A4-1stR	TGAAAACCTTGAAATACACTAGGC	136460

^a The 5'-end of each primer on AF297093.1.

Table 2. Summary of UGT1A4 polymorphisms detected in four studies

SNP ID	Position	From the translational initiation site or from the end of exon 1 (IVS1+)	Nucleotide change and flanking sequences (5' to 3')	Amino acid change	Japanese (This study)				Frequency (n=100)	Frequency (n=78)	Frequency (n=159)
					Wild-type	Hetero-zygote	Homo-zygote	Number of subjects			
rs3732219	5'-flanking	-219	GGTCAGATGAGC/TTTTCAAGATAG		195	54	7	0.133			
	5'-flanking	-217	GTCAGATGAGCT/TTCAAGATAGGC		255	1	0	0.002			
rs3732218	5'-flanking	-163	TAACGAAAGGCAG/TTATAGATTAA		195	54	7	0.133			
	5'-flanking	-36	CAGGCACAGCGT/GAGGGTGGACAGTC		255	1	0	0.002			
rs3892221	Exon 1	30	GGTCCCTGCCG/ACGGCTGGCCACA	P10P	254	2	0	0.004			
rs6755571	Exon 1	31	GTTCCCTGCCG/TGGCTGGCCACAG	R11W	250	6	0	0.012			
	Exon 1	70	CTCAGTCCAGC/ACCTGGCTGAGA	P24T	256	0	0	0.000	0.077	0.075	
	Exon 1	127	AGCCCTGGCTC/LGCATGGGGAGG	43fsX22	255	1	0	0.002			
rs2011425	Exon 1	142	ATGGGGAGGGCT/GTGGGGAGCTCC	L48V	197	52	7	0.129	0.165	0.095	
	Exon 1	175	GGCCACCAGGGG/LGGTCTCACCC	59fsX6	255	1	0	0.002			
	Exon 1	271	AAGGAATTGAT/CTGGTTACGCTGG	R91C	255	1	0	0.002			
	Exon 1	325	CATCTTGAAGA/LGGATATCTAGAA	R109G	255	1	0	0.002			
	Exon 1	357	AATTATGAACAAT/CGTATCTTTGGCC	N119N	254	2	0	0.004			
rs12468274	Exon 1	448	TTTGATGGTT/CTAACAGACCCCG	L150L	195	54	7	0.133	0.155		
rs2011404	Exon 1	471	CGTTAACCTCTGCTGGGGGGTGGTG	C157C	251	5	0	0.010			
rs3732217	Exon 1	804	CTACCCAGGCCG/ATCATGCCCAAC	P268P	195	54	7	0.133	0.165		
	Intron 1	IVS1+1	CCACTATCTCAGG/TCTGTATTGGTG		255	1	0	0.002			
rs2011219	Intron 1	IVS1+43	TTCCAGGCAAA/CTACTTTTAAAAA		195	54	7	0.133	0.155		
	Intron 1	IVS1+98	ACTTATCTTCCA/GAAGATTTATTT		255	1	0	0.002			
	Intron 1	IVS1+101	TATCTTCCAAA/GTATTTTATTITGG		253	3	0	0.006			

^a Novel variations detected in this study.

^b The SNPs included in the PharmGKB database was shown as "O".

^c T in the reference sequence.

^d Mori A, et al., Drug Metab Disp. 2005;33:672-675.

^e Patients at H. Lee Moffitt Cancer Center in Tampa, Florida, Wiener D, et al., Cancer Research, 2004;64:1190-1196.

^f Elmer U., et al., Hepatology 2004;39:970-977.

Table 3. *UGT1A4* haplotypes in a Japanese population

Nucleotide change ^a	-219	-217	-163	-36	30	31	127	142	175	271	325	357	448	471	804	IVSI +1 G>T	IVSI +43 C>T	IVSI +98 A>G	IVSI +101 G>T	Frequency	
	C>T	T>G	G>A	G>A	G>A	R11W	43fsX22	L48V	59fsX6	R91C	R109G	N119N	L150L	C157C	P268P		C>T	A>G	G>T		
Amino acid change	*1a																			0.818	
	*1b																				0.010
	*1c																				0.008
	*1d																				0.006
	*1e																				0.004
	*1f																				0.004
	*1g																				0.002
	*1h																				0.002
*3	*3i																				0.002
	*3a																				0.123
*4																					0.002
*5																					0.012
*6																					0.002
*7																					0.002
*8																					0.002
*8a																					0.002

^aA of the translational start codon of *UGT1A4* is numbered 1. AF297093.1 was used as the reference sequence.

^bThe haplotypes were described as a number plus a small alphabetical letter.

Table 4. Glucuronidation activities of P24T and L48V towards various substrates

Substrate	Category	Ehmer ^b		Wiener ^d		Mori ^f	
		Expressed in HEK293 cells		Human liver microsome		Expressed in COS-7 cells	
		UGT1A4	UGT1A4	24P/24T+	24P/24T	UGT1A4	UGT1A4
		Wild type	P24T	24P/24P	24T/24T	Wild type	L48V
		(pmol/mg/min)		(pmol/mg/min)		Vmx/K.m	
β -Naphthylamin	Carcinogenic	31.8	9.7	18.2			
Benzidine	aromatic amine	1.9	n.d. ^c	1.3			
trans-Androsterone		86	54	1.5		0.42	4.35
Dihydrotestosterone	Androgene	27	18	n.d. ^c			
NNAL ^a	nicotine-derived nitrosamine				10.0 \pm 5.7	13.9 \pm 5.2 ^e	
Clozapine						25.4 \pm 4.8	52.7 \pm 13.1 ^g
Imipramine	Antipsycotic					0.61	1.07
Cyproheptadine	Antihistamine					1.51	2.35
Tigogenin	Plant steroid					20.33	9.16

^a 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone

^b Ehmer U., et al., *Hepatology* 2004;39:970-977.

^c not detected

^d Wiener D, et al., *Cancer Research*, 2004;64:1190-1196.

^e significantly different from the result of 24P/24P

^f Mori A, et al., *Drug Metab Disp.* 2005;33:672-675.

^g significantly different from the result obtained by UGT1A4 wild type

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)
分担研究報告書

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
分担研究者 家入 一郎 九州大学大学院薬学研究院薬物動態学分野・助教授

研究要旨: 本年度は以下について重点的に検討した;(1) OCT1, OCT2遺伝子多型と糖尿病治療薬メトホルミンの治療効果との関連評価、(2) BSEP遺伝子多型探索。メトホルミンには一定の割合でノンレスポナーが存在することから、作用部位である肝輸送に関与するOCTsとの関連を多型から評価した。OCT1,2の多型探索から開始したが、同定した変異の中で408Met>Val (1222A>G) の関与を強く認め、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。(2) ポセンタンは肺高血圧症治療薬として世界で初めて認可された経口エンドセリン受容体拮抗薬であり、患者数はすくないものの、治療効果が期待される数少ない治療薬である。しかし、肝障害が報告されている。本検討では、肝輸送に関与するBSEP遺伝子変異の関与を疑い検討を開始した。多型探索の結果、444Val>Alaを含む4箇所のアミノ酸置換を伴う変異を同定し、このうち3箇所は頻度が低いものの新規変異であった。また、プロモーター領域にも比較的頻度の高い変異が存在し、ハプロタイプを形成していると思われる。現在、数名の服用患者の解析を実施中である。

A. 研究目的

薬物トランスポーター遺伝子多型と基質薬物の臨床効果、副作用との関連を評価することで、大きな個人差の原因を解明すると同時に、原因遺伝子多型の人種差を明らかにすることで、医薬品開発、適正使用に有益な情報の提供を目指す。

B. 研究方法

(1) OCT1, OCT2遺伝子多型とメトホルミン血糖降下作用との関連評価; 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) 臨床効果との関連評価に先立ち、BSEP遺伝子多型解析を日本人DNAを用いて検討した。(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、総ての研究は鳥取大学医学部倫理審査委員会で、審査・承認を受けた後実施した。

B. 研究結果

(1) OCT1, OCT2遺伝子多型と糖尿病治療薬メトホルミンの治療効果との関連評価; 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、OCT1mRNA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。(2) BSEP遺伝子多型探索; 多型探索の結果、444Val>Alaを含む4箇所のアミノ酸置換を伴う変異を同定し、このうち3箇所は頻度が低いものの新規変異であった。また、プロモーター領域にも比較的頻度の高い変異が存在し、ハプロタイプを形成していると思われる。現在、数名の服用患者の解析を実施中である。

D. 考察

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、OCT1mRNA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一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) 肺高血圧症を適応にする医薬品は少なく、新薬であるポセンタンが期待されている。しかし、本薬物の副作用として肝障害が知られている。ポセンタンが肝排泄されるためには、排出トランスポーターであるBSEPが機能することがin vitro実験で示唆されている。そこで、肝障害が胆汁排泄の遅延によるものと考え、本検討を着手した。BSEPの遺伝子多型探索から開始した。新規変異の同定とともに、haplotypeの存在が示唆された。今後、臨床データの収集とその評価を実施する予定である。

E. 結論

糖尿病薬、肺高血圧症治療薬の効果や副作用に関連が予想される遺伝子の特定と多型の評価を実施した。人種差等の評価を加えていく予定である。

F. 健康危険情報

特にないが、疾患や医薬品効果の個人差解明に関する知見が得られた。

G. 研究発表(紙上発表)

別紙一覧を参照。

(学会発表)

別紙一覧を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在までに出願、登録はない。

分担研究報告書

ヒト肝組織における SLCO1B1 及び CYP3A mRNA 発現量の人種差
分担研究者 千葉 寛 千葉大学大学院教授

研究要旨

平成17年度は、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、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ことから、今後これらの検体がどのような要因によって発現量の低下が引き起こされているかを明らかにする必要があるものと考えられた。

A. 研究目的

ヒト肝細胞に発現する薬物取り込みトランスポーターである Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1/OATP-C, gene symbol SLCO1B1) は、肝臓に特異的に発現し、他の OATP ファミリーと比較し肝臓における発現量が高いことが報告されている。また OATP1B1 は、胆汁酸などの生体内物質に加えて HMG-CoA 還元酵素阻害薬など多くの薬物の肝臓への取り込みに関与していることから、様々な化合物の肝選択的移行を制御する重要なトランスポーターである。

薬物トランスポーターに個人差を生じる原因には、その機能や発現量における個人差が考えられる。これまでに OATP1B1 には機能低下を伴う一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) が複数報告されている。なかでも、膜貫通領域内にアミノ酸置換を伴う SNP のひとつである 521T>C は、OATP1B1 の細胞膜上における

発現量を減少させ、OATP1B1 による基質輸送量を低下させるとの報告がある。このように OATP1B1 の遺伝子多型による輸送活性の個人差は、その基質となる様々な化合物の体内動態に大きな影響を与えるものと考えられる。

一方、CYP3A は、多くの医薬品の代謝に重要な役割を果たす CYP subfamily であり、CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43 の4分子種からなる。これらの分子種の中で医薬品の代謝に最も重要なのは CYP3A4 であり、CYP で代謝を受ける薬物の 50%以上に関わっているとされている。CYP3A4 の肝臓における発現量に 10-50 倍のばらつきがあり、クリアランスでも 11-48 倍のばらつきがある。この原因の一つとして遺伝子多型の存在が示唆されているが、これまでに、報告されている CYP3A4 遺伝子に関する変異発現頻度の多くは白人種について解析されたものであり、日本人や黒人種に関する情報は少ない。

本研究では、白人、日本人およびヒスパ

ニックにおける *SLCO1B1* 及び *CYP3A4* の個人差と人種差を、これらの人種の肝組織における mRNA 発現量を比較することにより検討し、得られた結果を遺伝子多型との関係から考察した。

B. 研究方法

1 肝組織

白人種肝検体 (Caucasian liver, CL, n = 25) およびヒスパニック肝検体 (Hispanic liver, HL, n = 5) は、Human and Animal Bridging 協議会から御恵与賜った。上記検体は、National Disease Research Interchange を介して得た移植不適合のヒト肝組織および肝細胞である。日本人種肝検体 (Japanese liver, JL, n = 31) およびヒスパニック肝検体 (HL, n = 1) は、国立国際医療センターおよび国立がんセンター東病院から御恵与賜った。上記検体は、これらの施設において手術を受けた患者の切除肝組織の正常部位である。本研究におけるこれら検体の研究利用は、千葉大学薬学研究院倫理審査委員会において事前に承認されている。

2 ヒト肝組織からの total RNA の抽出および first strand cDNA の合成

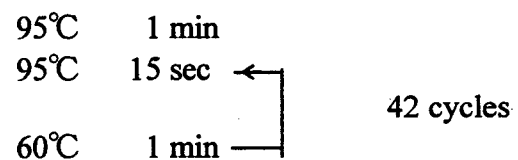
ヒト肝組織からの total RNA の抽出は、SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) を用いてプロトコール通りにおこなった。約 30 mg の肝組織切片より得られた total RNA は、Ultrospec 4000 UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて 260 nm および 280 nm の吸光度を測定することにより定量した。Total RNA の純度は、ホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動により 28S ribosomal RNA (rRNA) と 18S rRNA の比をとることにより確認した。またゲノム DNA 混入の有無は、AmpliQ Gold (Applied Biosystems, CA, USA) と table 1 に示した primer (human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH) forward and reverse) (Proligo, Boulder, CO, USA) を用いた PCR によりおこない、ゲノム DNA の混入が認められたものについては DNase I (TaKaRa Bio, Shiga, Japan) 処理によりゲノム DNA を除去した。

First strand cDNA の合成は Ready-to-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech) を用いてプロトコール通りにおこなった。Total RNA 2 µg、random hexamer (Amersham Pharmacia Biotech) 2.5 µL を混合した溶液を用いて、次に示す PCR 条件により逆転写反応をおこなった：42°C 30 min、95°C 5 min。

3 Real time PCR 法

PCR および DNA 増幅の検出は、ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystems) を用いておこなった。反応液は、テンプレートとして cDNA 1 µL、2×Real time PCR Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) 12.5 µL、TaqMan probe および primer を含む *SLCO1B1* 及び *CYP3A4* 遺伝子の TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) 1.25 µL、さらに内部標準遺伝子の probe と primer を含む TaqMan® PreDevelopped Assay Reagents (Applied Biosystems) 1.25 µL を混合し、滅菌 MilliQ で全量を 25 µL とした。この反応液を用いて、以下に示す条件で PCR をおこなった。



mRNA 発現量の補正方法は、Vandesompele ら (2002) や Jacques ら (2005) の報告を参考として、*SLCO1B1* 遺伝子の発現量を 4 種の内部標準遺伝子 (human GAPDH、human cyclophilin (Cyc)、human β-glucuronidase (GUS) および human acidic ribosomal protein (PO)) の測定値の平均値で割ることにより補正した。

4 ヒト肝組織からのゲノム DNA 抽出法

ヒト肝組織からのゲノム DNA 抽出は、ヒト肝組織約 30 mg から ChargeSwitch[®] gDNA Micro Tissue Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) を用いてプロトコール通りにおこなった。DNA の定量および純度の測定は、Ultrospec 4000 UV/Visible Spectrophotomete (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて 260 nm および 280 nm の吸光度を測定することによりおこなった。

5 Genotyping 法

SNP の genotyping はダイレクトシーケンシング法によりおこなった。目的の SNP を含む領域はヒト肝ゲノム DNA を template とし、primer を用いた PCR 法により増幅した。反応液は、template DNA 2 μ L、10 \times PCR Buffer for KOD -Plus- 5 μ L、dNTP mixture 5 μ L、10 μ M primer 1.6 μ L、KOD -Plus- DNA Polymerase (TOYOBO) 1.0 μ L を混合し、滅菌 MilliQ で全量を 50 μ L とした。PCR 反応は以下に示す方法によりおこなった。

94°C	2 min	} 40 cycles
94°C	15 sec	
54°C	20 sec	
68°C	35 sec	
68°C	3 min	

得られた PCR 産物は、2.5% アガロースゲルを用いて電気泳動し、Promega Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) により精製した。

6 統計解析

統計解析は以下の方法を用いておこなった。白人、日本人、およびヒスパニックの3つの人種間における mRNA 発現量の比較は、one-factor ANOVA (analysis of variance between groups) を用いておこなった ($P < 0.025$)。白人、日本人およびヒスパニック

ク各群における SNP の保有者と非保有者間の mRNA 発現量の比較は、Mann-Whitney U test を用いておこなった ($P < 0.05$)。ルシフェラーゼアッセイ法における転写活性化能の差は、Student's t-test によっておこなった ($P < 0.05$)。いずれの解析においても P 値が 0.05 以下の場合において有意差ありとした。上記の統計計算は、Statcel エクセル統計ソフト (オーエムエス, Tokyo, Japan) を用いておこなった。

C. 研究結果

1. 白人、日本人およびヒスパニックの肝における SLCO1B1 mRNA 発現量の個人差

ヒト肝検体における SLCO1B1 mRNA 発現量を測定した結果、ヒト肝 62 検体 (Caucasian, $n = 25$; Japanese, $n = 31$; Hispanic, $n = 6$) の中で CL 4 が最も低い値を示した。以降、この測定値を基準 (=1) として各検体について相対比 (arbitrary units) をとることとした。

白人種肝における SLCO1B1 mRNA 発現量を比較した結果、検体間で約 30 倍の差が認められた (Fig. 1)。このうち著しく発現量の低い検体が 2 検体 (CL 4, CL 23)、発現量の低い傾向を示す検体が 2 検体 (CL 21, CL 28) 存在した。これら 4 検体を除く残りの検体間で比較すると、SLCO1B1 mRNA 発現量に関して約 3 倍の差が認められた。日本人種肝における SLCO1B1 mRNA 発現量を比較した結果、検体間で約 4.5 倍の差が認められた (Fig. 2)。このうち著しく発現量の高い検体が 2 検体 (JL 34, JL 38) 存在した。これら 2 検体を除く残りの検体間で比較すると、SLCO1B1 mRNA 発現量に関して約 3 倍の差が認められた。ヒスパニック肝における SLCO1B1 mRNA 発現量を比較した結果、検体間で約 1.7 倍の差が認められた (Fig. 3)。白人、日本人およびヒスパニックの 3 つの人種間における SLCO1B1 mRNA 発現量を比較した結果、その平均値はそれぞれ 15.44、18.65、18.82 (arbitrary

units) となり、これらの中に有意な差は認められなかった ($P = 0.34$, one-factor ANOVA, Fig. 4)。

2. 白人、日本人およびヒスパニック肝における *SLCO1B1* mRNA 発現量への SNP (-11187G>A) の影響

ヒト肝 62 検体のゲノム DNA を用いて、*SLCO1B1* 遺伝子 5' 上流領域における SNP (-11187G>A) の解析をおこなった結果、SNP (-11187G>A) と wild type (-1187G>G) の heterozygote は、白人種においては $n = 5$ (約 20%)、日本人種においては $n = 5$ (約 16%)、ヒスパニックにおいては $n = 0$ (約 0%) 認められた。残りの検体に関しては、すべて wild type の homozygote であった。

次に SNP (-11187G>A) の *SLCO1B1* mRNA 発現量に対する影響を比較した結果、白人種および日本人種いずれにおいても 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 ($P = 0.95$, $P = 0.1$, one-factor ANOVA, Fig. 5)。

3. SNP (-11187G>A) の *SLCO1B1* 遺伝子 5' 上流領域に存在するの転写活性への影響

ヒト肝癌由来細胞の HepG2 細胞と FLC4 細胞を宿主細胞として、pGL3-Basic vector に *SLCO1B1* 遺伝子 5' 上流領域を組み込んだコンストラクトを用いた Reporter gene assay 法をおこなった結果、HepG2 細胞および FLC4 細胞いずれにおいても、転写活性化能に wild type と mutant の間には有意な差は認められなかった ($P = 0.12$, $P = 0.18$, Student's t-test, Fig. 6)。

4. 白人、日本人およびヒスパニック肝における CYP3A4 mRNA 発現量の人種差

白人種肝における CYP3A4mRNA 発現量を比較した結果 (Fig. 7)、検体間で約 4600 倍の差が認められた。このうち著しく発現量

の低い検体が 6 検体、発現量の低い傾向を示す検体が 10 検体存在した。これら 16 検体を除く残りの検体間で比較すると、CYP3A4mRNA 発現量に関して約 13 倍の差が認められた。

次に日本人肝における CYP3A4mRNA 発現量を比較した結果、検体間で約 25 倍の差が認められた。このうち発現量の低い傾向を示す検体が 1 検体存在した。この検体を除く残りの検体間で比較すると、CYP3A4mRNA 発現量に関して約 11 倍の差が認められた。次にヒスパニック肝における CYP3A4mRNA 発現量を比較した結果、検体間で約 318 倍の差が認められた。発現量の低い傾向を示す 1 検体を除く残りの検体間で比較すると、CYP3A4mRNA 発現量に関して約 8 倍の差が認められた。従って、いずれの人種においても発現量の低い検体を除いた場合には、約 10 倍の個人差が認められた。

D. 考察

白人種においては、他の多くの検体と比較し著しく *SLCO1B1* mRNA 発現量の低い検体および低い傾向を示す検体が 4 検体存在したことから、これらの検体には *SLCO1B1* mRNA 発現量を減少させる何らかの要因が存在する可能性が示唆された (Fig. 1)。一方日本人種においては、他の検体と比較し *SLCO1B1* mRNA 発現量の高い傾向を示す検体が 2 検体存在したことから、これらの検体には *SLCO1B1* mRNA 発現量を上昇させる何らかの要因が存在する可能性が示唆された (Fig. 2)。また、これらの検体を除いて *SLCO1B1* mRNA 発現量を比較した場合においても、日本人種および白人種いずれにおいても *SLCO1B1* mRNA 発現量に約 3 倍の差が認められたことから、上記とは別の要因が存在する可能性も考えられる。以上より、*SLCO1B1* 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。そこでさらに *SLCO1B1* mRNA 発現量に影

響を及ぼしうる要因について検討をおこなった。

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。まず、遺伝子多型に着目して検討をおこなった。これまでに OATP1B1 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、近年、*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 (Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7)、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。Niemi らの報告(2004)において *in vivo* でみられた pravastatin の体内動態変化については、*17 が SNP (-11187G>A) に加えて OATP1B1 タンパク質の機能低下を伴う SNP (521T>C) も併せ持っているため、後者の SNP が大きな影響を与えているものと考えられた。

一方、CYP3A4mRNA については、白人種において CYP3A4mRNA 発現量の低い検体が全体の半分以上を占めており、平均値を下げる結果となっている。実際、これら3人種間における CYP3A4mRNA 発現量の平均値はそれぞれ 1.8 ± 3.1 , 4.1 ± 2.9 , 7.1 ± 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 CYP3A4mRNA 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。

E. 結論

本研究の結果より *SLCO1B1* mRNA 発現量には大きな個人差が存在するが人種間では発現量に大きな差異は存在しないことが示された。また、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。さらに、*SLCO1B1* 遺伝子 5' 上流領域を組み込んだコンストラクトを用いた Reporter gene assay 法をおこなった結果、HepG2 細胞および FLC4 細胞いずれにおいても、転写活性化能に -11187G>A の wild type と mutant の間には有意な差は認められなかったことから、この SNP が *SLCO1B1* mRNA の発現量の個人差に関係している可能性は低いものと考えられた。

一方、CYP3A4mRNA 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ことから、今後これらの検体がどのような要因によって発現量の低下が引き起こされているかを明らかにする必要があるものと考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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.

H. 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