

## 資料 2

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）

## 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18年度はワルファリンの薬効発現関連遺伝子と人種差の関係（越前）、グルクロニル転位酵素分子種の遺伝子多型と人種差（鹿庭）、トランスポーター（BCRP,SLCO1B3 他）、4）リバビリンの薬効発現に関係する核酸トランスポーターの同定と人種差（千葉）に関する検討を行い、以下の結果を得た。1）ワルファリン投与量の人種差に関しては、VKORC1の1173 C>T 変異の頻度が日本人で極めて高く、ワルファリン感受性を高める原因となっている。一方、CYP2C9の活性低下に関係する変異アレル頻度は日本人では低いため、ワルファリン投与量の人種差を説明するものではない。2）血中総ビリルビン濃度との関連解析より、Block 1 の#28 及び#6 をそれぞれ単独でホモ接合体として持つか、あるいは両遺伝子変異を同時に有している場合には UGT1A1 の活性は低下する。3）オルメサルタンの体内動態と OATP1B1 521T>C の強い関与が認められ、C allele 保有者で有意な AUC の上昇が観察される。SLCO1B3 及び SLCO2B1 の多型解析では多くの変異を同定したが、一部は黒人で多い傾向にあった。4）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、日本人肝臓検体における mRNA およびタンパク発現量にはそれぞれ約 5.6 倍および約 2.9 倍の個人差が存在する。以上の結果より以下の結論を得た。1）白人では CYP2C9 のジェノタイプは投与量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投与量の予測には有用性が低い。2）白人種及び黒人種と異なり、日本人においては、Block 1 の#28 及び#6 を有している個体では UGT1A1 の活性が低下する。3）オルメサルタンの体内動態に OATP1B1 521T>C が影響を与える。4）SLCO1B3 及び SLCO2B1 の変異遺伝子の発現頻度には人種差が存在する。5）リバビリンの肝取り込みに主に関与する核酸トランスポーターは hENT1 であり、その 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。

#### 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準教授

#### 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。申請者らは平成16年度までの3年間、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」を通じて、CYP3A4、CYP2C9、UDP-グルクロン酸転位酵素、SLCO1B1 (OATP-C)、BCRPなどの遺伝子について、遺伝子多型と薬物動態の人種差に関する基本的な情報を蓄積してきた。

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していくことを目的としている。平成17年度は1) ワルファリン応答性の人種内および人種差に係る遺伝子多型を明らかにした、2) OCT1408Met 型患者では、メトホルミン肝取り込みに関与する発現量が低下し、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可能性を明らかにした、3) UGT1A4 に新規変異を10個見出すとともに、これらの SNP 及び既知 SNP の頻度到人種差が存在することを明らかにした、4) 日本人、白人種、ヒスパニック (メキシコ系アメリカ人) における CYP3A4 及び SLCO1B1 mRNA 発現量の人種差などを明らかにした。

平成18年度も引き続き、ワーファリンの薬効発現関連遺伝子を越前が、グルクロニル転位酵素分子種を鹿庭が、トランスポーター (BCRP, SLCO1B3) の解析を家入が行い、千葉はリバビリンの薬効発現に係る核酸トランスポーターの同定と人種差に関する検討を行った。

## B. 研究方法

ワルファリン感受性の人種差については、CYP2C9 翻訳領域の多型で薬物動態あるいは酵素活性に明確な影響を持つことが確認されている変異アレルと、ワルファリンの抗凝固作用の標的分子である VKORC1 の多型アレルとのワルファリン投与量の個人間変動に対する関与度を3人種試料を用いて検討した。具体的には、CYP2C9 の多型は PCR-制限酵素断片長多型 (RFLP) 法又はシークエンスにより判定し、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。また、VKORC1 の多型は VKORC1 1173 C>T 変異の有無を解析し、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。

UGT については、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 及び手

術で切除されたヒト肝組織 16 検体を用いた。ディプロタイプは、expectation-maximization-based プログラム、LDSUPPORT を用いて推定した。

トランスポーターについては(1) 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 BCRP 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。(2) 臨床効果との関連評価に先立ち、SLCO1B3, SLCO2B1 の遺伝子多型解析を実施した。(3) SLCO family 遺伝子多型の機能評価を目的にオルメサルタン体内動態との関連を評価した。

核酸トランスポートに関しては、2種の核酸系抗癌剤を用いた選択により単離した Madin Darby Canine Kidney (MDCK) -NTD (Nucleoside Transport Deficient) 22 細胞株に hENT1, hCNT2, hCNT3 および hENT2 の cDNA をトランスフェクションし、安定発現系を作製した。この系を用いて、[3H]-uridine および [3H]-ribavirin の細胞内への輸送活性を測定し、速度論的パラメータを算出した。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。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。

## C. 研究結果及び考察

### 1) ワルファリン感受性

CYP2C9 活性低下に関連する CYP2C9\*2 および CYP2C9\*3 の頻度は、黒人、白人、日本人 (アジア) で 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、年齢、体重も考慮した多変量解析を行うと、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ピング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。

## 2) UGT

(1) 健常志願者 554 人の DNA を用いて、UGT1A1 の 4 箇所の変異、-3279T>G、-40-39insTA、211G>A、及び、1941C>G のタイプピングを行った。最も頻度の高かったコンビネーション・ハプロタイプは #1-#1A (頻度 0.545) で、#6-#1A (同 0.171)、#28-#1A (同 0.107)、#60-#1A (同 0.079)、#1-#1B (同 0.060)、#60-#1B (同 0.038) の順に続いていた。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ところ、#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。

次に、#1B 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-#1B 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。その結果、#1-#1A/#28-#1A 群又は #1-#1A/#6-#1A 群に対して、#60-#1B/#28-#1A 群又は #60-#1B/#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。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-#1B/#60-#1B 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。上記より、Block 1 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、及び、#28 又は #6 いずれかに加えて #60-#1B を有している場合には、血中総ビリルビン濃度が上昇すること、#60 単独では血中総ビリルビン濃度に影響を及ぼさないが、#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、血中総ビリルビン濃度の上昇に相加的に作用すると考えられた。

(2) ヒト肝組織 16 検体を用いて、UGT のプロモーター領域及び 3'UTR 上の変異が、肝臓における UGT の mRNA 発現量に及ぼす影響を検討するための予備検討として、各肝組織について、UGT2B7 -327G>A、UGT1A9 -126\_-118 T9>T10、UGT1A1 -3279 T>G、UGT1A1 -40\_-39 ins TA、UGT1A1 211 G>A 及び UGT1As 1941C>G の各多型のタイプピングを行った。UGT2B7 -327G>A のアレル頻度は 0.188 で、この値は日本人のアレル頻度として報告されている値 0.293 より若干低かった。UGT1A9 については、今回のサンプルでは、全ての検体が UGT1A9 -126\_-118 T9>T10 を有しており、そのアレル頻度は 0.781 であった。UGT1A1 の観測された各多型の頻度は、-3279T>G が 0.093、-40\_-39insTA が 0.093、及び、211G>A が 0.312 であった。今回のサンプルにおける -3279 T>G の頻度は、健常日本人で得られたアレル頻度より有意に低く、また、この変異を有するサンプルが全て #28 であり、#60 が検出されなかった。-40\_-39insTA の頻度については、今回のサンプルは健常日本人における頻度と差がなかった。一方、211G>A の頻度は、今回のサンプルでは、健常日本人におけるよりも、有意差はないものの高かった。今回のサンプルが手術によって切除された肝組織であることを考慮すると、UGT1A1 の多型の分布が健常人とは異なる可能性も考えられた。全 UGT1A 分子種共通エクソンにおける変異 1941 C>G の頻度は 0.031 であった。これは、健常日本人で観測された頻度より若干低い傾向にあった。また、このサンプルの中には、#60-#1B は検出されなかった。

## 3) トランスポーター

(1) BCRP 421C>A に注目して検討を行ったが 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。

(2) SLCO1B3 遺伝子多型探索の結果、334T>G (112Ser>Ala)、699G>A (233Met>Ile) を含む 11 箇所の変異を同定した。

(3) SLCO2B1 遺伝子多型探索の結果、

109C>T (37Pro>Thr)、601G>A (201Val>Met)を含む11箇所の変異を同定した。この中には、exon 2の76位の9塩基欠損が含まれ、ヘテロ型の頻度は14%であり、高頻度であった。

(4)3人種間で上記の変異アレル頻度を比較した結果、SLCO1B3の334T>G、699G>Aは黒人で高頻度(約50%)であった。一方、SLCO2B1のexon 10にある1457C>T(486Ser>Phe)は黒人と日本人での頻度が0.3-0.4であったのに対し、白人では、0.2であった。

(5)オルメサルタン体内動態に与えるSLCO1B1、SLCO1B3の変異の影響を検討した。その結果、SLCO1B1の521T>C変異でC<sub>max</sub>の有意な上昇、SLCO1B3のT334G変異でC<sub>min</sub>の有意な上昇が観察された。

4)リバピリンの肝取り込みに関与するトランスポーター

(1)野生型MDCK細胞と核酸系抗癌剤で選択したMDCK-NTD22細胞におけるウリジン取り込み活性を比較した結果、MDCK-NTD22細胞のウリジン取り込み活性は野生型MDCK細胞の15分の1まで低下していることが明らかとなった。この細胞にhENT1、hENT2、hCNT2およびhCNT3を安定発現させ、ウリジン取り込みに対する速度論的解析をおこなったところ、既報と同程度のK<sub>m</sub>値であり、核酸トランスポーターの輸送活性を評価する際のホスト細胞として有用であることが示された。次に、この系を用いてリバピリン取り込みに対する速度論的解析をおこなったところ、hENT1のK<sub>m</sub>値は357.1  $\mu$ Mであり、hCNT2のK<sub>m</sub>値は40.6  $\mu$ Mであり、hCNT3のK<sub>m</sub>値は親和性の高い成分は2.1  $\mu$ Mであり、親和性の低い成分は36.7  $\mu$ Mであった。hENT2はリバピリン取り込み活性を示さなかった。これらの結果より、リバピリンの取り込みに関与するトランスポーターはhENT1、hCNT2およびhCNT3であることが明らかとなった。

(2)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<sup>+</sup>存在下およびNa<sup>+</sup>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<sup>+</sup>-dependent、

Na<sup>+</sup>-independent NBMPR sensitive、Na<sup>+</sup>-independent hypoxanthine sensitiveおよびNa<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-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。

#### D. 結論

1. 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ると考えられた。
2. 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。
3. 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た。
4. 今回の解析から既知のpharmacogenomics情報では説明できないワルファリン投与量の個人間変動が40-50%存在することも判明した。この変動機構を追求することが最終年度の目標として設定された。
5. 日本人においては、Block 1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。また、#60と#IB

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-#IB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。

6. ヒト肝組織16検体を用いて、UGT類の変異とmRNAの発現量との関連を検討した結果、用いたヒト肝組織のサンプルのUGT1A1の一部の多型の頻度は、健常人のものとは有意に異なっていることが明らかとなった。
7. 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いるが、医薬品の吸収率に大きな影響を与える可能性があることから、SLCO1B3, SLCO2B1遺伝子多型の関与はさらに検討を続けていくことが必要と考えられた。
8. リバピ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、そのmRNA発現量およびタンパク発現量には比較的大きな個人差があることが明らかとなった。今後、白人肝検体の検討を進め日本との人種差を明らかにする必要があると考えられた。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

1. Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA, Morita T, Ritchie MD, Scordo MG, Pengo V, Barban M, Padriani 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.
2. M. Saeki, Y. Saito, K. Sai, K. Maekawa, N. Kaniwa, J. Sawada, M. Kawamoto, A. Saito and N. Kamatani: A combinatorial haplotype of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene (#60-#IB) increases total bilirubin concentrations in Japanese volunteers.

*Clin. Chem.*, 53, 356-358, 2007.

3. Shikata E, Yamamoto R, Takane H, Shigemasa C, Ikeda T, Otsubo K, Ieiri I. Human organic cation transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin. *J Hum Genet.* 2007;52(2):117-22.
4. Ieiri I, Takane H, Hirota T, Otsubo K, Higuchi S. Genetic polymorphisms of drug transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006 Oct;2(5):651-74.
5. Takane H, Miyata M, Burioka N, Shigemasa C, Shimizu E, Otsubo K, Ieiri I. Pharmacogenetic determinants of variability in lipid-lowering response to pravastatin therapy. *J Hum Genet.* 2006;51(9):822-6.
6. Maeda K, Ieiri I, Yasuda K, Fujino A, Fujiwara H, Otsubo K, Hirano M, Watanabe T, Kitamura Y, Kusuhara H, Sugiyama Y. Effects of organic anion transporting polypeptide 1B1 haplotype on pharmacokinetics of pravastatin, valsartan, and temocapril. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 May;79(5):427-39.
7. Shikata E, Yamamoto R, Takane H, Shigemasa C, Ikeda T, Otsubo K, Ieiri I. Human organic cation transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin. *J Hum Genet.* 2007;52(2):117-22.
8. 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.

##### 学会発表

- 1) 橋詰 美里、降幡 知巳、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
- 2) 降幡 知巳、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回トランスポーター研究会(東京)、2006年12月
- 3) 橋詰 美里、降幡 知巳、福地 由希菜、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

著書

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.

F.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

G. 健康危険情報

なし

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  
ワルファリンの薬効発現関連遺伝子を中心に

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ことが広く認識され、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および薬物標的分子の多型情報の研究が大きな進歩を遂げている。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 ファミリーのなかで、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ワルファリンをモデル薬物として検討した。その結果、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%低い人種差の原因が、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ことを明らかにした。ワルファリン投与量の個人差には薬物動態関連分子である CYP2C9 と薬力学関連分子であるビタミン K エポキシド還元酵素複合体 1（VKORC1）の多型がそれぞれ関連するが、両機能分子蛋白の変異アレルの頻度には大きな人種差があるので、pharmacogenomics 情報のワルファリン応答性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 のジェノタイプピングは投与量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変異アレル頻度が低いため投与量の予測には有用性が低く、むしろ過剰応答を示す患者の原因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。分担者は、本プロジェクトにおいて、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手承を受けた上で収集した試料を用いた。

今年度においては、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て、CYP2C9 翻訳領域の多型で薬物動態あるいは酵素活性に明確な影響を持つことが確認されている変異アレルと、ワルファリンの抗凝固作用の標的分子である VKORC1 の多型アレルとのワルファリン投与量の個人間変動に対する関与度を 3 人種



試料を用いて検討した。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、Kidss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。また、VKORC1の多型頻度は3人種各150名の試料を用いて、D'Andreaらの報告したVKORC1 1173 C>T変異の有無を解析した。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。

### C. 研究結果

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。

### D. 考察

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た。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られる。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。

今回の解析から既知の pharmacogenomics 情報では説明できないワルファリン投与量の個人間変動が40-50%存在することも判明した。この変動機構を追求することが最終年度の目標として設定された。

#### 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.

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.

##### 2. 学会発表 ありません

#### 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。

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  
グルクロン酸転移酵素遺伝子の解析

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

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。また、UGT の分子種の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する目的で、ヒューマンサイエンス振興財団より入手したヒト肝組織を用いて、予備的検討を行った。血中総ビリルビン濃度との関連解析より、白人種及び黒人種と異なり、日本人においては、Block 1 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。また、#60 と #IB 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-#IB 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。ヒト肝組織 16 検体を用いた予備検討の結果、用いた手術により切除したヒト肝組織のサンプルでは、UGT1A1 の一部の多型の頻度が、健常人のものとは有意に異なっていた。

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。そのために、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にひとつに、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。

平成 17 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、昨年度、筆者は、UGT1A4 の遺伝子多型の種類と頻度の人種差を明らかにした。

今年度は、主として、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、日本人における UGT1A1 の活性低下の遺伝的要因を検討した。また、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する目的で、ヒューマンサイエンス振興財団より入手したヒト肝組織を用いて、予備的検討を行った。

B. 研究方法

(1) 試料

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。また、手術で切除されたヒト肝組織 16 検体は、ヒューマンサイエンス振興財団より入手した。

(2) 遺伝子のタイピング

肝組織又は Epstein-Barr ウィルス形質転

換リンパ芽球細胞より抽出した DNA を用いてタイピングを行った 1-3)。

### (3) ディプロタイプの推定

個々の健康志願者のディプロタイプは、expectation-maximization-based プログラム、LDSUPPORT4)を用いて行った。

### (4) 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。肝組織は連結不可能匿名化された試料であり、健康志願者より得た試料も当研究所では連結不可能匿名化された試料とみなされるものであったので、個人情報本研究から遺漏する恐れはなかった。いずれの試料を用いた研究も、国立衛研の倫理委員会より承認を得て実施された。

## C. 研究結果

### (1) UGT1A1 のコンビネーション・ハプロタイプ (#60-#IB) と血中総ビリルビンとの関連

健康志願者 554 人の DNA を用いて、UGT1A1 の 4 箇所の変異、-3279T>G、-40-39insTA、211G>A、及び、1941C>G のタイピングを行った。UGT1A1 の Block 1 における多型、-3279T>G、-40-39insTA、211G>A のタイピングの結果から、各被験者の Block 1 のディプロタイプ(ハプロタイプの組み合わせ)を決定した。すなわち、Block 1 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 211G>A のみを有するアレル、#28 は-3279T>G と -40-39insTA を同時に有するアレル、及び、#60 は-3279T>G のみを有するアレルとした。一方、Block 2 については、1941C>G のタイピングの結果から、ハプロタイプ#IA は 1941C>G を有しないアレルとし、#IB 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 (#IA 及び#IB の組み合わせ)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。

最も頻度の高かったコンビネーション・ハプロタイプは#1-#IA (頻度 0.545) で、#6-#IA (同 0.171)、#28-#IA (同 0.107)、

#60-#IA (同 0.079)、#1-#IB (同 0.060)、#60-#IB (同 0.038)の順に続いていた。

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 (Fig. 1)。Dunnett multiple comparison による解析結果から、#1-#IA/#1-#IA 群に比較して#6-#IA/#28-#IA 群( $p<0.0001$ )、#6-#IA/#6-#IA 群( $p<0.0001$ )、#6-#IA/#60-#IB 群( $p<0.0133$ )、#60-#IA/#28-#IA 群( $p<0.0186$ )、及び、#28-#IA/#28-#IA 群( $p<0.0213$ )で、有意に血中総ビリルビン濃度が高かった。#6-#IA 群及び#28-#IA 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 5)と一致していた。なお、本研究では、ヘテロザイゴートの#6-#IA 群又は#28-#IA 群では、血中の総ビリルビン濃度の上昇は見られなかった。

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-#IA の#28-#IA 又は#6-#IA に対する相加効果の影響を検討した。Fig. 1 に示す如く、#1-#IA/#28-#IA 群又は#1-#IA/#6-#IA 群に対して、#60-#IB/#28-#IA 群又は#60-#IB/#6-#IA 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-#IA/#28-#IA 群又は#60-#IA/#6-#IA 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-#IA/#6-#IA 群と#60-#IB/#6-#IA 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-#IA/#1-#IA 群、#1-#IA/#60-#IA 群、#60-#IA/#60-#IA 群よりも高かった。なお、#28 又は#6 と組まない#60-#IB のヘテロザイゴート群では、血中総ビリルビン濃度の上昇は認められなかった。上記より、Block 1 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、及び、#28 又は#6 いずれかに加えて#60-#IB を有している場合には、血中総ビリルビン濃度が上昇すること、#60 単独では血中総ビリルビン濃度に影響を及ぼさないが、#60 と#IB 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-#IBである場合に、血中総ビリルビン濃度の上昇に相加的に作用すると考えられた。

(2) 肝組織を用いた UGT1A9 及び UGT2B7 のプロモーター領域及び UGT1As の 3'UTR 領域の変異と mRNA の発現量との関連

UGT1A9 のプロモーター領域における変異、-126\_-118 T10 (UGT1A9\*22) は、in vitro 実験において、野生型に比し、転写活性が 2.6 倍になると報告されている 6)。この多型の日本人における頻度は 60~65%程度であり 6, 7)、この頻度は、白人種 (39%)、黒人種 (44%) よりも高い 6)。

全ての UGT1A 分子種に共通する 3'UTR の変異 1941C>G は、黒人種 (0.183)、白人種 (0.157)、日本人 (0.097) の順でアレル頻度が低くなる 2)。前節で Block 1 のハプロタイプ#60と#IBが同一染色体に存在する場合には、血中ビリルビン濃度が高くなり、グルクロン酸抱合能が低下することが示唆されたので、この染色体上での組み合わせが転写活性の変動に加えて mRNA の安定性へ影響を及ぼしている可能性も考えられた。

一方、UGT2B7 には、2つの SNP、-325G>A、-161C>T が存在し、日本人における頻度は 0.254~0.293 と報告されている 8, 9)。なお、この 2つの SNP は、日本人ではアミノ酸変異を伴う SNP 802C>T (H268Y) (UGT2B7\*2) と完全な連鎖を示す 8)。UGT2B7\*2 の白人種における頻度は、0.489 と報告されている 9)。

そこで、ヒト肝組織 16 検体を用いて、UGT のプロモーター領域及び 3'UTR 上の変異が、肝臓における UGT の mRNA 発現量に及ぼす影響を検討し、これらの変異によって生じる活性の変動が UGT 活性の人種差に及ぼす影響について考察することにした。

本年度は、予備検討として、各肝組織について、UGT2B7-327G>A、UGT1A9-126\_-118 T9>T10、UGT1A1-3279 T>G、UGT1A1-40\_-39 ins TA、UGT1A1 211 G>A、及び UGT1As 1941C>G の各多型のタイピングを行い、mRNA 発現量の解析対象を選択した。

Table 1 に各多型の測定結果を示した。今回のサンプルにおける UGT2B7-327G>A の

アレル頻度は 0.188 で、この値は日本人のアレル頻度として報告されている値 0.293 より若干低かったが、その差は有意ではなかった ( $p=0.175$ )。UGT1A9 については、今回のサンプルでは、全ての検体が UGT1A9-126\_-118 T9>T10 を有しており、そのアレル頻度は 0.781 であった。この頻度は、著者らが既に測定した、イリノテカンを服用した日本人癌患者における同多型のアレル頻度は 0.6667) と差がなかった ( $p=0.137$ )。

UGT1A1 の観測された各多型の頻度は、-3279T>G が 0.093、-40\_-39insTA が 0.093、及び、211G>A が 0.312 であったが、著者らが 150 人の健常日本人より得た DNA で測定した頻度は、それぞれ、0.257、0.097、0.157 であった 2)。今回のサンプルにおける -3279 T>G の頻度は、健常日本人で得られたアレル頻度より有意に低く ( $p=0.00415$ )、また、この変異を有するサンプルが全て #28 であり、#60 が検出されなかった。-40\_-39insTA の頻度については、今回のサンプルは健常日本人における頻度と差がなかった。一方、211G>A の頻度は、今回のサンプルでは、健常日本人におけるよりも、有意差はないものの高かった ( $p=0.0668$ )。この多型は、日本人において高ビリルビン血症を誘発する Gilbert 症候群の原因多型のひとつとされている。今回のサンプルが手術によって切除された肝組織であることを考慮すると、UGT1A1 の多型の分布が健常人とは異なる可能性も考えられた。全 UGT1A 分子種共通エクソンにおける変異 1941 C>G の頻度は 0.031 であった。これは、健常日本人で観測された頻度 0.0972) より若干低い傾向にあったが有意ではなかった ( $p=0.0599$ )。また、このサンプルの中には、#60-#IB は検出されなかった。

以上の結果より、mRNA の発現量の検討では、UGT2B7-327G>A 及び UGT1A9-126\_-118 T9>T10 の影響については、全サンプルを解析対象とすることとした。しかし、活性の低下が示唆された #60-#IB のコンビネーション・ハプロタイプについては、今回のサンプルの中にこのコンビネーションを有するものがなかったために、今回のサンプルはコントロール群として扱うことにした。

#### D. 考察

著者らは既に、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、UGT1A1 -40-39insTA (\*28)の他に、211G>A (\*6)を考慮しなければいけないことを明らかにしてきた(2, 7)。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、著者らは、1941C>G (\*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(3)、今回の検討で、\*1B と-3279T>G (\*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、UGT1A7、UGT1A1 はイリノテカンの活性代謝物である SN-38 の解毒化に関与することが知られている。UGT1A9 -126\_-118 T9>T10 は、*in vitro* では転写活性が増大することが確認されているが、UGT1A1 や UGT1A7 の幾つかの多型とリンクしており、イリノテカンの臨床効果との関連解析においては、その単独の効果を検討することが難しい(7)。また、UGT2B7 のプロモーター領域における SNP が *in vitro* 転写活性に及ぼす影響は検討されているが、肝臓における発現への影響については検討されていない。さらに、今回、UGT1A1 の活性低下に 3'UTR における SNP が関与していることが明らかになったが、UGT1A1 の転写調節領域における多型の影響は多く検討されているにもかかわらず、3'UTR 領域における変異が mRNA の発現量に及ぼす影響は検討されていない。ヒト肝組織における mRNA 発現量を検討することにより、これらの多型の発現頻度の人種差の臨床的意義を明らかにすることができると期待できる。今後は、さらに検体数を増やし、遺伝子のタイピングを行うと共に、mRNA の発現量の解析を開始する予定である。

#### E. 結論

血中総ビリルビン濃度との関連解析より、日本人においては、Block 1 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。また、#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。

ヒト肝組織 16 検体を用いて、UGT 類の変異と mRNA の発現量との関連を検討するための予備検討を行った。タイピングの結果、用いたヒト肝組織のサンプルの UGT1A1 の一部の多型の頻度は、健康人のものとは有意に異なっていた。

#### 謝辞

本研究へご協力いただいた協力研究者の国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学・室長・頭金正博博士、同・主任研究官・黒瀬光一博士、国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部・室長・斎藤嘉朗博士、国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・主任研究官・佐井君江博士、及び、流動研究員・佐伯真弓博士に深謝致します。

#### 参考文献

1. Saeki M, Saito Y, Jinno H, Tohkin M, Kurose K, Kaniwa N, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Ozawa S, Sawada J. Comprehensive UGT1A1 genotyping in a Japanese population by pyrosequencing. *Clin Chem*. 2003 Jul;49(7):1182-5.
2. N. Kaniwa, K. Kurose, H. Jinno, T. Tanaka-Kagawa, Y. Saito, M. Saeki, J. Sawada, M. Tohkin and R. Hasegawa: Racial variability in haplotype frequencies of UGT1A1 and glucuronidation activity of a novel SNP 686C>T (P229L) found in an African-American. *Drug Metab. Dispos.*, 33, 458-465, 2005.
3. Sai K, Saeki M, Saito Y, Ozawa S, Katori N, Jinno H, et al. UGT1A1 haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese patients with cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75:501-515.
4. Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Ozawa S, Kurose K, et al. Haplotype structures of the UGT1A gene complex in a Japanese

- population. *Pharmacogenomics J* 2006; 6: 63-75.
5. Kaplan M, and Hammerman C, Bilirubin and the genome: the hereditary basis of unconjugated neonatal hyperbilirubinemia. *Curr. Pharmacogenomics* 2005;3:21-42
  6. Yamanaka H, Nakajima M, Katoh M, Hara Y, Tachibana O, Yamashita J, McLeod HL, Yokoi T. A novel polymorphism in the promoter region of human UGT1A9 gene (UGT1A9\*22) and its effects on the transcriptional activity.. *Pharmacogenetics*. 2004 May;14:329-32.
  7. H. Minami, K. Sai, M. Saeki, Y. Saito, S. Ozawa, K. Suzuki, N. Kaniwa, J. Sawada, T. Hamaguchi, N. Yamamoto, K. Shirao, Y. Yamada, H. Ohmatsu, K. Kubota, T. Yoshida, A. Ohtsu and N. Saijo: Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: Roles of UGT1A1\*6 and \*28. *Pharmacogenet. Genomics*, in press, 2007.
  8. Saeki M, Saito Y, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Ohno A, Ozawa S, Ueno K, Kamakura S, Kamatani N, Komamura K, Kitakaze M, Sawada J. Single nucleotide polymorphisms and haplotype frequencies of UGT2B4 and UGT2B7 in a Japanese population. *Drug Metab Dispos*. 2004 Sep;32:1048-54.
  9. Bhasker CR, McKinnon W, Stone A, Lo AC, Kubota T, Ishizaki T, Miners JO. Genetic polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) at amino acid 268: ethnic diversity of alleles and potential clinical significance. *Pharmacogenetics*. 2000 Nov;10:679-85.
  10. Duguay Y, Baar C, Skorpen F, Guillemette C. A novel functional polymorphism in the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 2B7 promoter with significant impact on promoter activity. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Mar;75:223-33.
- 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, K. Sai, K. Maekawa, N. Kaniwa, J. Sawada, M. Kawamoto, A. Saito and N. Kamatani: A combinatorial haplotype of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene (#60-#1B) increases total bilirubin concentrations in Japanese volunteers. *Clin. Chem.*, 53, 356-358, 2007.
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

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  
BCRP、SLCO1B3 遺伝子多型の機能評価を中心に

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・准教授

研究要旨

BCRP、SLCO1B3 遺伝子多型の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。その結果、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 HMGC-Co-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、基質特異性の存在が疑われた。現在、抗リウマチ薬での臨床試験を実地しているが、421C>A による著明な体内動態の差が観察されており、本仮説が確認されつつある。SLCO family については、1B3 と 2B1 の多型解析を実施するとともに、SLCO1B1 多型も含め、ARB であるオルメサルタンの体内動態との関連を白人を対象として検討した。多型解析では多くの変異を同定したが、一部は黒人で多い傾向にあった。オルメサルタンの *in vitro* レベルでの肝取り込みには、OATP1B1 と OATP1B3 の関与が認められている。ヒトでの評価では、OATP1B1 521T>C の強い関与が認められ、C allele 保有者で有意な AUC の上昇が観察された。また、SLCO1B3 では、T334G の関与が示唆された。現在、N の数を 120 名程度増やし、検討を続けている。これらの変異の血圧降下作用への影響の解明が今後の課題となる。

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体内動態、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とすることで、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) 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 BCRP 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。(2) 臨床効果との関連評価に先立ち、SLCO1B3、SLCO2B1 の遺伝子多型解析を実施した。(3) SLCO family 遺伝子多型の機能評価を目的にオルメサルタン体内動態との関連を評価した。(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、総ての研究は九州大学大学院薬学研究科倫理審査委員会で、審査・承認を受けた後実施した。

C. 研究結果

(1) BCRP 421C>A に注目した。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。(2)-1 SLCO1B3 遺伝子多型探索(日本人)；多型探索の結果、334T>G (112Ser>Ala)、699G>A (233Met>Ile) を含む 11 箇所の変異を同定した。(2)-2 SLCO2B1 遺伝子多型探索(日本人)；多型探索の結果、109C>T (37Pro>Thr)、601G>A (201Val>Met) を含む 11 箇所の変異を同定した。この中には、exon 2 の 76 位の 9 塩基欠損が含まれ、ヘテロ型の頻度は 14% であり、高頻度であった。(2)-3 人種間比較；SLCO1B3 の 334T>G、699G>A は黒人で高頻度(約 50%)であった。SLCO2B1 の



exon 10にある1457C>T(486Ser>Phe)は黒人と日本人での頻度が0.3-0.4であったのに対し、白人では、0.2であった。(3) オルメサルタン体内動態に関与する薬物トランスポーターとして、SLCO1B1、SLCO1B3が推定された。多型との関連では、SLCO1B1の521T>C変異でCmaxの有意な上昇、SLCO1B3のT334G変異でCminの有意な上昇が観察された。

#### D. 考察

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いる。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。SLCO1B3, SLCO2B1 遺伝子多型の関与もさらに検討を続けていくことが必要と言える。

#### E. 結論

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いる。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。SLCO1B3, SLCO2B1 遺伝子多型の関与もさらに検討を続けていくことが必要と言える。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1: Shikata E, Yamamoto R, Takane H, Shigemasa C, Ikeda T, Otsubo K, Ieiri I. Human organic cation transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin. J Hum Genet. 2007;52(2):117-22.

2: Ieiri I, Takane H, Hirota T, Otsubo K, Higuchi S.

Genetic polymorphisms of drug transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic

consequences in pharmacotherapy. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2006 Oct;2(5):651-74.

3: Takane H, Miyata M, Burioka N, Shigemasa C, Shimizu E, Otsubo K, Ieiri I. Pharmacogenetic determinants of variability in lipid-lowering response to pravastatin therapy. J Hum Genet. 2006;51(9):822-6.

4: Maeda K, Ieiri I, Yasuda K, Fujino A, Fujiwara H, Otsubo K, Hirano M, Watanabe T, Kitamura Y, Kusuhara H, Sugiyama Y. Effects of organic anion transporting polypeptide 1B1 haplotype on pharmacokinetics of pravastatin, valsartan, and temocapril. Clin Pharmacol Ther. 2006 May;79(5):427-39.

5: Shikata E, Yamamoto R, Takane H, Shigemasa C, Ikeda T, Otsubo K, Ieiri I. Human organic cation transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin. J Hum Genet. 2007;52(2):117-22.

##### 学会発表

1. 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年
2. 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-九州山口薬学会ファーマシューティカルシンポジウム、長崎、2007

#### 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 なし

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  
リバビリンの肝取り込みに寄与するトランスポーターの同定と人種差の解析

分担研究者 千葉 寛 千葉大学大学院教授

研究要旨

リバビリンと Interferon- $\alpha$  の併用療法は高い奏効率を示すことから、C 型肝炎の標準的治療法となっている。本研究ではリバビリンの肝取り込みに寄与するトランスポーターを同定し、日本人肝臓における発現量と個人差に関する検討を行うことにより、リバビリンの薬効発現に個人差が起こる原因を明らかにするとともに、リバビリンの薬効発現に関連するトランスポーター活性に人種差が存在するか否かを明らかにするための基礎的検討を行った。まず、野生型 MDCK 細胞を核酸系抗癌剤で選択し、内因性核酸トランスポート活性の低い哺乳動物細胞を単離した。得られた MDCK-NTD22 細胞におけるウリジン取り込み活性を比較したところ、MDCK-NTD22 細胞のウリジン取り込み活性は野生型 MDCK 細胞の 15 分の 1 まで低下していることが明らかとなり、本細胞系が核酸トランスポーターの輸送活性を評価する際のホスト細胞として有用であることが示された。次に、リバビリンを輸送する核酸トランスポーター分子種を同定するために、cDNA クローニングにより得られた hENT1, hENT2, hCNT2 および hCNT3 の安定発現系を用いてリバビリン取り込みに対する速度論的解析をおこなった。その結果、リバビリンの細胞膜輸送に関与する核酸トランスポーターは hENT1, hCNT2 および hCNT3 であり、なかでも hENT1 および未同定のトランスポーターがヒト肝臓におけるリバビリンの取り込みに大きく寄与していることが明らかとなった。さらに、日本人肝検体 (n=18) における 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、膜面分における hENT1 タンパク発現量には約 2.9 倍の個人差が認められた。今後、未同定のトランスポーターの同定および肝リバビリントランスポーターの機能および発現量の個人差の解析をおこなうとともに、白人肝検体を用いて同様の検討を行うことにより、リバビリンの薬効発現に関連する核酸トランスポーター活性の人種差の存在を明らかにしていきたい。

A. 研究目的

リバビリンと Interferon (IFN) - $\alpha$  の併用療法は IFN 単独療法と比較して高い奏効率を示すことから、C 型肝炎の標準的治療法となっている。リバビリンは、リン酸化を受けてはじめて抗ウイルス作用を示すと考えられていることから、リバビリンが薬効を発揮するためには肝細胞内に取り込まれる必要がある。リバビリンはグアノシン誘導体であり、親水性が高いため何らかの輸送単体を介して肝細胞内に取り込まれると考えられるが、これまでに、赤血球において equilibrative nucleoside transporter (ENT, SLC29A) 1 が、

小腸の吸収過程において Na<sup>+</sup>の濃度勾配を駆動力とする concentrative nucleoside transporter (CNT, SLC28A) 2 が細胞内取り込みに関与する可能性が示唆されて入るのみで、作用部位である肝臓におけるリバビリンの取り込みに寄与するトランスポーターは明らかでない。本研究ではリバビリンの肝取り込みに寄与するトランスポーターを同定し、その日本人肝臓における発現量と個人差に関する検討を行った。

B. 研究方法

核酸トランスポート欠損 Madin Darby Canine Kidney (MDCK) -NTD (Nucleoside Transport Deficient) 22 細胞株は2種の核酸系抗癌剤を用いた選択により単離した。hENT1, hCNT2, hCNT3 および hENT2 の cDNA クローニングは、ヒト小腸 cDNA およびヒト骨格筋 cDNA を用いて PCR 法によりおこなった。これら4種の cDNA をリポフェクション法により MDCK-NTD22 細胞にトランスフェクションし、安定発現系を作製した。これらを用いて、 $[3H]$ -uridine および  $[3H]$ -ribavirin の細胞内への輸送活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、速度論的パラメータ ( $K_m$  および  $V_{max}$ ) を算出した。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。

### C. 研究結果及び考察

#### 1. 核酸トランスポート欠損 MDCK-NTD22 細胞の単離および安定発現系を用いたリバビリン輸送に寄与する核酸トランスポーターの同定

野生型 MDCK 細胞と核酸系抗癌剤で選択した MDCK-NTD22 細胞におけるウリジン取り込み活性を比較した結果、MDCK-NTD22 細胞のウリジン取り込み活性は野生型 MDCK 細胞の15分の1まで低下していることが示された。cDNA クローニングにより得られた hENT1, hENT2, hCNT2 および hCNT3 の安定発現系を用いてウリジン取り込みに対する速度論的解析をおこなったところ、既報と同程度の  $K_m$  値であった。以上の結果より、MDCK-NTD22 細胞は遺伝子導入した核酸トランスポーターの輸送活性を評価する際のホスト細胞として有用である

ことが示された。次に、リバビリンを輸送する核酸トランスポーター分子種を同定するために、核酸トランスポーター安定発現 MDCK-NTD22 細胞を用いてリバビリン取り込みに対する速度論的解析をおこなった。その結果、hENT1 の  $K_m$  値は  $357.1 \mu M$  であり、hENT2 はリバビリン取り込み活性を示さなかった。hCNT2 の  $K_m$  値は  $40.6 \mu M$  であり、hCNT3 の  $K_m$  値は親和性の高い成分は  $2.1 \mu M$  であり、親和性の低い成分は  $36.7 \mu M$  であった。以上の結果より、リバビリンの取り込みに関与するトランスポーターは hENT1, hCNT2 および hCNT3 であることが明らかとなった。各々の発現量は不明であるが、肝臓において hENT1, hCNT2, hCNT3 が発現していることから、リバビリンの取り込みにこれらのトランスポーターが寄与する可能性が考えられた。

#### 2. ヒト遊離肝細胞を用いたリバビリン輸送活性阻害実験および日本人肝臓における hENT1 mRNA 発現量および hENT1 タンパク発現量の個人差の解析

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ビリンの輸送活性阻害を検討した。その結果、全リバビ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 がリバビ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 ( $n=10$ ) から膜面分を調製し、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。hENT1 mRNA 発現量と hENT1 タンパク発現量との相関を検討したところ、10 検体において相関は認められなかったものの、6 検体においては

高い相関が認められた。以上の結果より、リバビリンのヒト肝取り込みに大きく寄与するhENT1の発現量には大きな個人差が存在し、その発現量は転写および転写後調節により制御されているという可能性が示唆された。現在、人種差を検討するため、同様の検討を白人種肝臓検体で行っている。

#### E. 結論

本研究より、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、そのmRNA発現量およびタンパク発現量にはそれぞれ約5.6倍および約2.9倍の個人差があることが明らかとなった。今後、白人肝臓検体を用いて同様の検討を行い、日本との人種差の有無を明らかにしたい。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

学会発表

- 4) 橋詰 美里、降幡 知巳、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
- 5) 降幡 知巳、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回トランスポーター研究会（東京）、2006年12月
- 6) 橋詰 美里、降幡 知巳、福地 由希菜、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

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. 特許取得 なし

4. 実用新案登録 なし

3. その他 なし