

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド医療確立に関する研究

研究分担者 宮田茂樹 国立循環器病センター 輸血管理室 医長

研究要旨：ワルファリン必要投与量の個人差に対して、ワルファリンの主な代謝酵素である CYP2C9 ならびに標的分子である VKORC1 の遺伝子多型の関与を検討した報告が増加している。最近の報告では、これらの遺伝子多型、年齢、性別、体表面積、体重等の要因でワルファリンの 1 日投与量の個人差の約 55% が説明可能とされるものの、残る 45% は説明つかないとされる。その主因として、食事（ビタミン K 摂取量）の関与が推測されるが、その詳細な検討はない。

今回、CYP2C9 ならびに VKORC1 の遺伝子多型、食事調査票によるビタミン K を主とした栄養摂取状況などがワルファリンの投与量に与える影響について前向き横断研究を実施し、さらに、その季節変動等の検討を加えた多施設共同研究を開始した。

前向き横断研究の解析対象は 183 名となり、男性 130 名、女性 53 名（平均 71.9 歳）であった。ワルファリン 1 日投与量の平均は 75 歳未満で 3.5mg、75 歳以上で 2.9mg、ビタミン K 摂取量は平均 131.9 μ g であった。遺伝子多型の組み合わせでは 6 群に分類され、ワルファリン効果が発揮されやすい群が 3.2%、されにくい群が 1.6% 存在することが判明した。今後さらに、ビタミン K 摂取量、遺伝子多型、併用薬、体重等とのワルファリン投与量の関連を、多施設共同研究と合わせて検討していく予定である。

これらの解析により、患者個人に最適なワルファリン投与量を事前に推測し、より有効な抗凝固効果を示し、出血の副作用の最小化を可能とするワルファリン療法の個別化医療の確立を目指す。

A. 研究目的

抗凝固療法は、血栓塞栓症患者の予後改善に対し重要な治療であるが、血栓塞栓症の予防効果と、主に出血という副作用のリスクとのバランスの上に成立している。したがって、予防効果を最大限に発揮し、出血というリスクをいかに低減するかが、抗凝固療法確立のための重要な鍵となる。そのため、広く一般的に用いられている経口抗凝固薬であるワルファリンでは、その止

血効果を PT-INR (Prothrombin

Time-International Normalized Ratio : プロトロンビン時間-国際標準化比) を用いて評価し、投与量の調節を行なうことが推奨されている。実際、良好な PT-INR のコントロールは、血栓塞栓症のイベントならびに出血の副作用を抑制することが、大規模研究の結果として報告されている。しかしながら、ワルファリンの至適投与量には、個人差があり、また、同一患者においても

投与量の調整の必要性がしばしば発生するため、そのコントロールを困難としている。また、このことがワルファリン治療の普及、徹底を阻害している主因であると考えられている。

近年、ワルファリン必要量の個人差と遺伝子多型の関連性について、ワルファリンの主な代謝酵素であるチトクローム

P450 (CYP) 2C9 の遺伝子多型が発見され、野生型とのクリアランスの違いが明らかになった。また、ワルファリンの標的分子であるビタミン K エポキシド還元酵素 (vitamin K epoxide reductase complex subunit

1:VKORC1) の遺伝子多型が報告された。最近の報告では、CYP2C9、VKORC1 の遺伝子多型、年齢、性別、体表面積、体重等の要因でワルファリンの 1 日投与量の個人差の約 55% が説明可能とされる。しかし、残る 45% は説明のつかない部分として残されている。実際の臨床現場においては、経験的に食事等がワルファリンの必要投与量の変動に、なんらかの影響を及ぼしていると推測されている。しかしながら、今までのところ、食事の影響を加味して検討した研究結果の報告はほとんどない。そこで、本研究では、CYP2C9 ならびに VKORC1 の遺伝子多型とその他の生理学的要因に加えて、食事調査票の導入によってビタミン K を主とした栄養摂取状況がワルファリンの投与量に与える影響について検討し、患者個人に適した抗凝固療法 (個別化医療) の確立を目指す。

B. 研究方法

ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討 (The Study on the Contribution of Genetic Factors or

Dietary Vitamin K Intake to Individual Warfarin Dosage [Godward Study]: 前向き横断研究)

非弁膜性心房細動等の塞栓源となる心疾患もしくは血栓塞栓症を有し、少なくとも屋内自立の状態であり経口で普通食を摂取している患者群で、ワルファリンによる抗凝固療法を受けている外来患者を対象とし、前向き横断研究を実施した。患者本人の文書同意取得後、体重等の背景情報を調査するとともに VKORC1 および CYP2C9 の遺伝子多型検査を実施した。食事調査票を用いてビタミン K を含む各種栄養摂取量を推定するとともに、3 ヶ月間のワルファリン投与量と PT-INR の推移等について調査した。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理委員会の承認を受けた上で実施した。

ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討 (Godward-Multi Study): 多施設共同研究)

参加各施設に通院している患者で、非弁膜性心房細動等の塞栓源となる心疾患もしくは血栓塞栓症を有し、少なくとも屋内自立の状態であり経口で普通食を摂取している患者群で、ワルファリン療法を受けている患者を対象とし、多施設共同研究を計画した。患者本人の同意取得後、体重等の背景情報を調査するとともに VKORC1 および CYP2C9 の遺伝子多型検査を実施する。食事調査票記載時期の PT-INR 検査値を含む血液検査データを収集する。食事調査票を用いたビタミン K を含む各種栄養摂取量の推定に関しては、季節変動を調査するため、患者 1 名につき、原則として、春 (3-5 月)、夏 (6-8 月)、秋 (9-11 月)、冬 (12-2 月)

の4回食事調査を実施する。加えて、食事調査実施時期に合わせて、ビタミンK血中濃度を測定する。

(倫理面への配慮)

本研究について、すでに倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討 (Godward Study: 前向き横断研究)

最終的な解析対象は183名であり、男性130名、女性53名(平均71.9歳)であった。ワルファリン1日投与量の平均は75歳未満で3.5mg、75歳以上で2.9mg、ビタミンK摂取量は平均131.9 μ gであった。遺伝子多型の組み合わせでは6群に分類され、ワルファリン効果が発揮されやすい群が3.2%、されにくい群が1.6%存在することが判明した。これらの結果は preliminary な解析の結果であり、今後さらに、ビタミンK摂取量、遺伝子多型、併用薬、体重等とのワルファリン投与量の関連を検討していく予定である。

ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討 (Godward-Multi Study): 多施設共同研究)

倫理委員会の承認を得て、患者登録を開始した。今後、目標症例数400症例を目指して患者登録を進め、食事の季節変動を含め、詳細に検討を行っていく予定である。

D. 考察

近年、ファーマコゲノミクスが注目され、個別化医療という言葉も現実味を帯びてきている。その最先端をいくのがワルファリ

ンと遺伝子多型の研究である。

ワルファリン投与患者では、その効果をPT-INR等でモニタリングしながら投与量を調節し、治療を行っている。しかしながら、その投与量は、各個人によってかなりのばらつきがある。以前から、ワルファリンの代謝酵素CYP2C9の遺伝子多型がワルファリン反応性の個人差を説明するものとして報告されていたが、CYP2C9だけではうまく説明できなかった。2004年に、VKORC1がクローニングされ、多型解析から、本酵素の多型が極めて強くワルファリン必要量と関連することが明らかとなった。その後の多くの報告により、ワルファリンの個人差の約30%がVKORC1多型、約10%がCYP2C9多型、約15%が年齢、性別、併用薬などで説明されるとされる。しかし、残りの45%程度は、これら因子では説明できていない。

日本人における抗凝固作用は白人に比べ少量のワルファリンで維持される傾向にある。この一因として、白人のVKORC1遺伝子では、酵素活性の高いアレルの頻度が日本人に比べて高いので、VKORC1蛋白質が多く発現し、その活性を阻害するためには、多くのワルファリンが必要であると考えられる。また、日本人のVKORC1とCYP2C9の遺伝子多型頻度を解析した結果では、日本人の約78%は同一の遺伝子型を保有していることより、日本人のワルファリン維持量の個人差は比較的少ないと推定される。しかし、頻度は低いながらも、大量のワルファリンを必要とする日本人や、少ないワルファリン量で維持できると考えられる遺伝子多型の組み合わせを持つことが指摘されており、本研究の結果もそれを支持している。また、上

述したように、遺伝子多型のみでワルファリンの投与量が規定できるわけではなく、残る45%は未だ説明のつかない部分として残されている。その主因として、食事の影響(ビタミンK摂取量)が示唆されるが、それを詳細に検討した報告は少ない。今回、季節変動や、食事調査票を用いたビタミンK摂取量の推定、その季節変動、ビタミンK血中濃度の測定による、詳細な検討は、遺伝子多型情報を合わせて、ワルファリンの至適投与量の推定に重要な情報をもたらすものと期待できる。今後さらに、患者登録を進め、詳細な検討を行うことにより、患者個人に最適なワルファリン投与量を事前に推測し、より有効な抗凝固効果を示し、出血の副作用の最小化を可能とするワルファリン療法の個別化医療の確立を目指す。

E. 結論

CYP2C9、VKORC1の遺伝子多型、食事調査票によるビタミンKを主とした栄養摂取状況等がワルファリン必要投与量に与える影響について前向き横断研究を実施し、さらに、季節変動等の検討を加えた多施設共同研究を開始した。これら研究結果の解析により、患者個人に最適なワルファリン投与量を事前に推測し、より有効な抗凝固効果を示し、出血の副作用の最小化を可能とするワルファリン療法の個別化医療の確立を目指す。

F. 健康危険情報

特になし

G. 関連する研究発表

1. 論文発表

- 1) 宮田茂樹、宮田敏行、嘉田晃子、山本晴子、長東一行. 抗血栓薬の抵抗性と遺伝子. 分子脳血管病. 2008;7:408-417.
- 2) 宮田茂樹、宮田敏行、嘉田晃子、長東一行. アスピリンレジスタンス. BRAIN and NERVE. 2008;60:1357-1364.

2. 学会発表

- 1) 宮田茂樹: 血管外科に役立つ(抗)凝固療法、(抗)血小板療法の考え方. 第36回日本血管外科学会学術総会. 東京、2008

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

厚生科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究
- WNK1 遺伝子多型の血圧日内変動に及ぼす影響 -

研究分担者 神出 計 大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科 講師

研究要旨： 降圧薬の効果ならびに副作用に関与する遺伝子多型を同定し、臨床の現場に導入することより遺伝子情報に基づく高血圧個別化診療が可能になる。これを実現するために、我々は降圧薬感受性遺伝子を用いた前向き多施設臨床試験（GEANE2 研究）を本厚生科研にて計画している。GEANE2 研究で使用予定のサイアザイド利尿薬は食塩感受性の強い場合に、大変効果が期待される薬剤である。食塩感受性が強いと夜間血圧は上昇し、日中との血圧差の少ない non-dipper 型になることが知られている。そこで食塩感受性高血圧に関与が指摘されている、WNK1 遺伝子多型と血圧日内変動との関連を検討し、GEANE2 研究施行のための基礎情報とした。

A. 研究目的

食塩感受性は本態性高血圧の病態に深く関与し、血圧日内変動パターンを non-dipper 型にすることが知られている。利尿薬は non-dipper 型を dipper 型に改善することが知られており、食塩感受性高血圧の遺伝的素因の解明は大変重要である。今回、GEANE2 研究の基礎情報収集のため、食塩感受性との関連が指摘されている、Gordon 症候群の原因遺伝子である WNK1、WNK4 遺伝子の多型と血圧日内変動との関連を検討した。

B. 研究方法

対象は本態性高血圧患者 334 人（男性 167 人、女性 167 人）で、全例 A and D 社 TM2421 にて 30 分ごと 24 時間血圧を記録した。収縮期血圧 (SBP) の平均が夜間に 20mmHg 以上下がる患者を dipper 型、そ

れ以外を non-dipper 型と判定した。コーディング領域をダイレクト・シークエンスし、一塩基多型 (SNP) を同定した WNK1 ならびに WNK4 遺伝子の合計 9SNP で、マイナー・アレル頻度が 5%以上、 $r^2 > 0.5$ 以上の連鎖不平衡を有する場合はその中から 1SNP を選んで TaqMan 法にてタイピングを行った。

（倫理面への配慮）本研究を実施するにあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」にしたがった。検体はすべて連結可能匿名化方式にて臨床情報と合わせて解析を行った。

C. 研究結果

dipper (D) 型 100 例、non-dipper (ND) 型 234 例に判定された。dipper、non-dipper の患者背景ではそれぞれの 24 時間 SBP 平均が D 型： 136 ± 1 vs. ND 型： 140 ± 1 mmHg ($p=0.015$)、夜間平均 SBP が、D 型： 121 ± 1

vs. ND型: $138 \pm 1 \text{ mmHg}$ ($p < 0.0001$)と有意差を認めた。D, NDの頻度に差を認めた SNP は、*WNK1* 786G>A (rs3858703)で、additive model: $p = 0.0068$, dominant model: $p = 0.049$ (OR: 1.705, 95%CI: 1.000-2.909)、recessive model: $p = 0.004$ (OR: 12.26, 95%CI: 1.4-106.4)、G allele vs. A allele: $p = 0.009$ であった。この有意な関連性は年齢、性別、BMIといたった交絡因子を含めた多重ロジスティック解析にても有意な関連性を示していた ($p = 0.030$)。さらに 786G>A (rs3858703)と連鎖関係にある、ミスセンス多型の *WNK1* 10856C>T (The665Ile; rs2286007)は単独では、血圧日内変動と有意な関連性を認めなかったが、ハプロタイプ解析にて GG-TT ならびに AA-CT のハプロタイプで血圧日内変動と $p = 0.0002$ 以下の強い関連性を認めた。

D. 考察

今回の検討から *WNK1* 786G>A (rs3858703)単独ならびに 10856C>T (The665Ile; rs2286007)とのハプロタイプが本態性高血圧患者に血圧日内変動パターンに有意な関連性を示すことが示された。*WNK1* 遺伝子は食塩感受性に関与することが知られた遺伝子であり、この遺伝子多型と食塩感受性の直接の関係を検討したわけではないが、食塩感受性と密接に関与するとされる 24 時間血圧変動パターンとの関連性が示されたことは *WNK1* 遺伝子多型が食塩感受性を介して血圧日内変動に影響している可能性を示唆する結果である。non-dipper 型高血圧は心血管イベントを発症しやすいことが

知られており、*WNK1* 遺伝子多型を調べることにより、より予後の良くない高血圧を予見できる可能性がある。将来のテーラーメイド高血圧診療に活かせる基礎情報になると考えられる。

E. 結論

WNK1 遺伝子多型ならびにそのハプロタイプが本態性高血圧患者の血圧日内変動に関与することを明らかにした。血圧日内変動の non-dipper 型は心血管イベントに関連することが知られており、*WNK1* 遺伝子多型を検討することにより予後の良くない高血圧を予知できる可能性があり、今後のテーラーメイド医療に応用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamide K, Yang J, Matayoshi T, Takiuchi S, Horio T, Yoshii Y, Miwa Y, Yasuda H, Yoshihara F, Nakamura S, Nakahama H, Miyata T, Kawano Y. Genetic polymorphisms of L-type calcium channel α_{1c} and α_{1b} subunit genes are associated with sensitivity to the antihypertensive effects of L-type dihydropyridine calcium-channel blockers. *Circ J* (in press)
- 2) Yin T, Maekawa K, Kamide K, Saito Y, Hanada H, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Horio T, Takiuchi S, Kawano Y,

Minematsu K, Naritomi H, Tomoike T, Sawada J, Miyata T. Genetic variations of *CYP2C9* in 724 Japanese individuals and their impacts on the antihypertensive effects of losartan. *Hypertens Res* 2008;31:1549-1557.

- 3) Yang J, Kamide K, Kokubo Y, Takiuchi S, Horio T, Matayoshi T, Yasuda H, Miwa Y, Yoshii M, Yoshihara F, Nakamura S, Nakahama H, Tomoike H, Miyata T, Kawano Y. Association of hypertension and its complications with variations of the xanthine dehydrogenase gene. *Hypertens Res* 2008;31:931-940.

2. 学会発表

- 1) 神出 計、花田裕典、宮田敏行、嘉田晃子、森本茂人、中橋 毅、滝内 伸、石光俊彦、土橋卓也、相馬正義、荻原俊男、勝谷友宏、檜垣實男、大蔵隆文、松浦秀夫、品川達夫、笹栗俊之、三輪宜一、三木哲郎、伊賀瀬道也、武田和夫、島本和明、東浦勝浩、上野道雄、片淵律子、細見直永、加藤丈司、富田奈留也、駒井則夫、小嶋俊一、江口真透、藤田利治、佐瀬一洋、友池仁暢、河野雄平。降圧薬感受性遺伝子同定のための多施設前向き臨床試験 (GEANE 研究) 第 31 回日本高血圧学会、2008 年 10 月、札幌
- 2) Kamide K, Miyata T, Horio T, Yoshihara F, Nakata H, Nakamura S, Nakahama H, Morisaki T, Kawano Y. Gene polymorphism in *WNK1* is associated with twenty-four hours

blood pressure variation in patients with essential hypertension. the 22nd International Society of Hypertension 2008 Jun 15-20. Berlin, Germany.

- 3) Kamide K, Hanada H, Miyata T, Kada A, Eguchi S, Fujita T, Sase K, Tomoike H, Kawano Y GEANE study group. Gene Evaluation for ANtiHypertensive Effect of drugs- A Multicenter Trial - the 81st American Heart Association 2008 Scientific Sessions. 2008:Nov. 8-12. New Orleans, USA

- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

ワルファリン投与量に影響を与える VKORC1 と
CYP2C9 の遺伝子多型のタイピング法の確立

研究分担者	鎌倉史郎	国立循環器病センター	心臓血管内科	部長
研究協力者	太田直孝	国立循環器病センター	臨床検査部遺伝子検査室	技師
研究協力者	浦 敏郎	国立循環器病センター	臨床検査部遺伝子検査室	主任
研究協力者	宮本恵宏	国立循環器病センター	動脈硬化代謝内科	医長
研究協力者	吉政康直	国立循環器病センター	動脈硬化代謝内科	部長

研究要旨：ワルファリンの投与量は、年齢・性別・体重・併用薬等に加え、VKORC1 と CYP2C9 遺伝子の多型も関与している。ワルファリンの初期投与量を設定するには、両遺伝子の遺伝子多型情報の迅速・正確・簡便な方法が必要となる。ごく最近、理化学研究所ゲノムサイエンスセンターは、独自に開発した新規等温核酸増幅法（SmartAmp 法）を用いて、両遺伝子多型のタイピング法を開発した。ここでは、SmartAmp 法を用いて遺伝子多型の判定を試みた。

A. 研究目的

ワルファリンの投与量には個人差があり、個人差の約 40%は VKORC1 と CYP2C9 の遺伝子多型で、また、約 15%は年齢・性別・体重・併用薬などによって説明されると報告されている。このように、これらの遺伝子多型はワルファリン量の個人差に大きく影響することから、遺伝子多型を考慮してワルファリン投与量を推定する試みが米国でなされている。この場合、ワルファリンを服用しようとする患者の遺伝型の判定が迅速に行われる必要がある。血液から染色体 DNA を調製し、これを鋳型に PCR を行う従来法は時間がかかり迅速性に問題があった。

理化学研究所ゲノムサイエンスセンターは、遺伝子多型タイピングの新しい方法と

して等温核酸増幅法である SmartAmp 法を開発した。本法は血液から直接遺伝型をタイピングする手法であり、臨床検査の現場に適した手法である。そこで、理化学研究所から試薬一式の提供を受け、臨床検査として遺伝子タイピングを試みた。

B. 研究方法

ワルファリン服薬患者約 40 名の血液から染色体 DNA を調製した。この DNA を対象に、1) DNA シークエンス法、2) TaqMan 遺伝型決定法、3) SmartAmp 法、を用いて VKORC1 遺伝子多型と CYP2C9*3 アレルを決定した。

（倫理面への配慮）

全ての被験者は、研究の内容について説

明を受けた後、研究に協力する旨の同意書を書面で残している。遺伝子研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年12月28日全部改正）」を遵守して行う。

C. 研究結果

DNAシーケンス法とTaqMan法で遺伝子多型を決定したDNA試料を対象に、SmartAmp法で遺伝子多型のタイピングを試みた。ほとんどのDNA試料でタイピング結果はよい一致を示したが、わずかな試料で偽陽性の判定が見られた。

D. 考察

VKORC1とCYP2C9の遺伝子情報をワルファリン投与量に反映させるには、迅速・正確・簡便なタイピング法が必要となり、理化学研究所が開発したSmartAmp法はそれらを満たす大変魅力的な手法である。本研究では、SmartAmp法をワルファリンのテーラーメイド医療に用いることを目的として、染色体DNAを用いて本法の有用性を検討した。本法は大変感度が高く、簡便な手法であり、臨床検査レベルで用いることができる手法であった。しかし、僅かな試料で偽陽性の判定が見られた。この原因として幾つかの理由が考えられる。超高感度な手法のため、環境のクリーン度に関することや、DNAの質や量といったことも考えられ、今後の課題が提示された。

E. 結論

ワルファリン投与量にかかわる遺伝子のタイピングを行った。今後、正確なタイピングのための確立を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究

研究分担者 山本晴子 国立循環器病センター 臨床研究開発部 室長

研究要旨：先行研究で得られたワルファリンの投与量と遺伝子多型、ビタミンK摂取に関する解析を行いながら、ビタミンK摂取量における季節の影響についての研究を進めている。先行研究において、主として食事調査票の記載と回収に様々な問題が生じることが確認された。そのため、本研究ではこれらの点を改善するため、臨床研究開発部の支援を受けて臨床研究コーディネーターを2名配置し、食事調査票の回収の手順確認、各種配布物の準備、スクリーニングリスト等の作成など、円滑な研究実施のための整備を行った。

A. 研究目的

ワルファリンは至適投与量に大きな個人差があり遺伝子多型との関連が確認されている。しかしそれ以外に、食事（ビタミンK摂取量）との関連等の関与が推測される。本研究では遺伝子多型やビタミンK摂取量などワルファリン投与量に影響する因子を明確にするとともに、それらを含んだ予測値を基に個人の至適投与量を推定する方法を開発し、ワルファリン治療による有害事象の減少を目的とする。

B. 研究方法

血栓症の予防目的でワルファリンを服用している外来通院患者を対象に、ワルファリンの作用に大きな影響を与える CYP2C9 と VKORC1 の遺伝子多型の決定と四季のビタミンK摂取量の変動を食事調査票で調査する。先行研究として、3ヶ月間のPT-INR及びワルファリン服用量の推移と、その期間の食事調査を1回だけ行う研究を単施設

で実施した。その結果、高齢患者では食事調査票の記載に不備が多く、また持参するのを忘れるなど、回収にも非常に手間取ることが判明した。本研究では、3ヶ月毎に食事調査票を記載するため、調査票への記載の完成度を高めることと、迅速に回収することが必須となる。そのため、①当院臨床研究開発部の支援を受ける、②食事調査票記載に関する注意点をまとめたものを配布する、③インセンティブを高め、持参忘れ等を防ぐ工夫を行う等、研究を円滑に、かつ調査内容の質を高めるよう準備した。

（倫理面への配慮）

（1）医学研究及び医療行為の対象となる個人の人権の擁護

説明を十分に行い、同意を得た患者のみを対象とする。また、匿名化を行うので遺伝情報が外部に漏れない。個人を特定できる情報は連結可能匿名化を用いて管理する。

（2）医学研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益

対象となる患者は、すでにワルファリンを服用しているため、本研究への参加により治療方針が変わることはない。食事調査に御参加いただくことで、普段の食事内容の分析結果を提供することが可能であり利益となる可能性がある。前向き介入試験についてはワルファリン服用が必要な症例が対象であるため、治療方針は変わらない。入院期間の短縮につながれば利益となる。初期投与量が高容量となる場合には、慎重に止血検査を繰り返し、過剰投与にならないように注意を払う。

C. 研究成果

当院臨床研究開発部より研究支援を受けることとなり、2名の臨床研究コーディネーターが配置された。研究チームで定期的にミーティングを行い、食事調査票回収時の手順確認、配布物など各種資材の準備と他施設への供給、スクリーニングリストやワーキングシートの作成等が円滑に行われた。

D. 考察

臨床研究を円滑かつ効率よく実施するためには、抜けのないスムーズな実施手順の策定が欠かせない。また、研究協力者を適宜配置することが重要である。本研究では先行のパイロット研究での経験を生かして効率的な手順を決定し、研究開始前から臨床研究開発部の支援を得ることもでき、研究開始前に実施に向けた準備をすることができた。

E. 結論

研究開始前に、研究協力者の手配、実施

手順確認、各種研究資材の準備などを円滑に行うことができた。これら実務面での準備が、臨床研究を円滑に進める上で重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

SmartAmp 法によるワルファリン関連遺伝子タイピングに関する研究

研究分担者 レジャバ・アレキサンダー 理化学研究所 上級研究員

研究協力者 片山敦子 理化学研究所 研究員

研究要旨：遺伝子上の一塩基多型(SNP)や欠失、マイクロサテライトの繰り返し数の違いなどの多くは薬物代謝に関わっており、これを判定することで、薬剤の副作用や効能、投与量等の個人差を事前に明らかにすることができる。したがって医療現場にこれらの遺伝子診断を導入し、個人々々により適したオーダーメイド医療を実現することは、無為な投薬や治療法による副作用など患者にかかる負担を軽減し、患者のQOLを向上させるにあたり、将来的に必要な不可欠である。近年、個別化医療の実現のために様々な診断技術や装置が開発されているが、その迅速性、簡便性、正確性、価格などトータルで臨床現場が満足して使用できるような従来製品は存在しない。

ワルファリンは血液凝固因子の合成に関与し、血液の凝固を妨げるため、心房細動などによる血栓塞栓症の最も有効な予防薬としてしばしば用いられるが、その投与量にはかなりの個人差があることがわかっている。仮にワルファリンが必要以上に投与されれば、脳出血や大量消化管出血のような致命的な副作用が起こりうる。逆に十分量の投与が行われなければ、血栓により脳梗塞や心筋梗塞などのリスクが増大する。いずれにせよワルファリンにおける不適切な量の投薬は、重篤な結果を引き起こす可能性がある。

理化学研究所ゲノムサイエンスセンターが開発した新規等温核酸増幅法である SmartAmp 法は、上記の問題を一手に解決することができる優れた方法である。本調査研究では、国立循環器病センター及び理化学研究所において SMAP 法によるタイピングを行い、臨床情報と併せて解析を行う。結果は理化学研究所にフィードバックされ、より実用化に向けてシステムの改善を行う。

A. 研究目的

ワルファリンの投与量に関連する遺伝子である VKORC1 及び CYP2C9*3 の迅速かつ簡易遺伝子タイピングシステムを開発・確立することにより、従来のように様子を見ながらワルファリンの投与量を決定するのではなく、始めからあらかじめ適量を投与することが可能

となるようなシステムの開発を行なう。

B. 研究方法

VKORC1 及び CYP2C9*3 の野生型及び変異型遺伝子を組み込んだプラスミドを作成し、それらを鋳型として、タイピングシステムの開発を行う。また健常者より提供された血液を

用いて、システムの検討をすすめる（理化学研究所倫理委員会の承認済み：承認番号 H18-8）提供者からはインフォームドコンセントを取得した。倫理面での問題は無い。国立循環器病センター内においても、提供された検体によりタイピングシステムの可否を検討する。国立循環器病センターにおける解析結果を理化学研究所にフィードバックし、タイピングシステムの改善を行う。

（倫理面への配慮）

全ての被験者は、研究の内容について説明を受けた後、研究に協力する旨の同意書を書面で残している。遺伝子研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年 12 月 28 日全部改正）」を遵守して行う。

C. 研究結果

SmartAmp 法による VKORC1 及び CYP2C9*3 のタイピングシステムを開発した。両遺伝子とも、サンプルを血液とした場合、約 45 分で、SNP タイピングを行うことができた。また SmartAmp 法による結果と、従来法（RFLP）による結果は、完全に一致し、本法の特異性の高いことが確認された。

しかし国立循環器病センターにおける検体の解析において、わずかではあるが複数の検体において、偽陽性の判定が見られ、今後の課題が提示された。

D. 考察

C（研究結果）において述べたように、多くの血液検体を用いて SmartAmp 法によるタイピングシステムを検討した結果、特に CYP2C9*3 において、数検体の偽陽性が見られた。また検出シグナルの強さや検出時間にも、

時によりばらつきが見られた。

検討の結果、これは、開発時の鋳型として主にプライマーを用い、さらには血液を鋳型とした場合にも健康人のみを用いていたため、既に薬剤投与されていたり、あるいは健康状態に種々の問題のある一般人（患者）の血液状況に対応できなかったものと考えられ、臨床サンプルに即した系の開発が求められる。

E. 結論

ワルファリン投与量に関わる遺伝子の迅速かつ簡易遺伝子増幅において、基本的なタイピングシステムを完成することができた。今後は臨床検体解析を通じて、システムの改良を行っていく必要がある。具体的にはプライマー設計の再検討、さらにはより S/N 比の高い蛍光検出システムの開発等を行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Aomori T, Yamamoto K, Oguchi-Katayama A, Kawai Y, Ishida T, Mitani Y, Kogo Y, Lezhava A, Fujita Y, Obayashi K, Nakamura K, Kohnke H, Wadelius M, Ekström L, Skogastierna C, Rane A, Kurabayashi M, Murakami M, Cizdziel PE, Hayashizaki Y, Horiuchi R. Rapid Single-Nucleotide Polymorphism Detection of Cytochrome P450 (CYP2C9) and Vitamin K Epoxide Reductase (VKORC1) Genes for the Warfarin Dose Adjustment by the SMart-Amplification

Process Version 2. Clinical Chemistry. in press.

2. 学会発表

片山敦子、青森達、川井雄輝、石田尾武文、
三谷康正、Hugo Kohnke、Mia Wadelius、
Alexander Lezhava、林崎良英

BMB2008（第31回日本分子生物学会年会・第
81回日本生化学会大会 合同大会）ポスター
発表

『SMAP法を用いた簡易遺伝子診断による、ワ
ルファリン投与量の判定』（4P1170）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究

研究分担者 古賀政利 国立循環器病センター 内科脳血管部門 医師

研究要旨：先行研究で得られたワルファリンの投与量と遺伝子多型、ビタミンK摂取量に関する解析を行いながら、ビタミンK摂取量における季節の影響についての研究を進めている。国立循環器病センターでは2008年10月23日、倫理委員会において研究プロトコルが承認され、2009年1月14日より症例登録が開始された。2009年2月20日までに83例が登録され、食事調査票の回収、ビタミンK採血などプロトコル通りに研究が進行している。

A. 研究目的

ワルファリンは至適投与量に大きな個人差があり遺伝子多型との関連が確認されている。しかしそれ以外に、食事（ビタミンK摂取量）との関連等の関与が推測される。本研究では遺伝子多型やビタミンK摂取量などワルファリン投与量に影響する因子を明確にするとともに、それらを含んだ予測値を基に個人の至適投与量を推定する方法を開発し、ワルファリン治療による有害事象の減少を目的とする。

B. 研究方法

血栓症の予防目的でワルファリンを服用している外来通院患者を対象に、ワルファリンの作用に大きな影響を与える CYP2C9 と VKORC1 の遺伝子多型の決定と四季のビタミンK摂取量の変動を食事調査票で調査する。それぞれの季節の調査期間は1ヶ月で、最初の季節は同時にビタミンKの血中濃度を測定する。背景因子としてはこれまで関連が認められている、身長、体重、性

別、肝機能、腎機能、併用薬の調査を行う。

（倫理面への配慮）

（1）医学研究及び医療行為の対象となる個人の人権の擁護

説明を十分に行い、同意を得た患者のみを対象とする。また、匿名化を行うので遺伝情報が外部に漏れない。個人を特定できる情報は連結可能匿名化を用いて管理する。

（2）医学研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益

対象となる患者は、すでにワルファリンを服用しているので、本研究への参加により治療方針が変わることはない。食事調査に御参加いただくことで、普段の食事内容の分析結果を提供することが可能であり利益となる可能性がある。前向き介入試験についてはワルファリン服用が必要な症例が対象であるので、治療方針は変わらない。入院期間の短縮につながれば利益となる。初期投与量が高容量となる場合には、慎重に止血検査を繰り返し、過剰投与にならないように注意を払う。

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

C. 研究成果

国立循環器病センターでは2008年10月23日、倫理委員会において研究プロトコルが承認され、2009年1月14日より症例登録が開始された。先行研究で一度食事調査を実施している症例から登録を開始しているために、登録は順調で2009年2月20日までの間に83例が登録され、食事調査票の回収とビタミンKの採血も進んでいる。

D. 考察

国立循環器病センターでは先行研究での経験を生かし、食事調査票の回収、記載漏れのチェックに十分配慮しながら、他施設に先行してすでに症例登録が始まっている。同意取得率は95例中83例と非常に高く、当院の目標である200例の参加を得られることは十分可能であると考えている。

E. 結論

ワーファリンの至適投与量に対する遺伝子多型と食事の季節変動が与える影響について、国立循環器病センターでは研究が予定通り進行中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(学会発表)

前田亘一郎、古賀政利、豊田一則、森真由美、永沼雅基、峰松一夫：脳出血急性期における抗血栓療法の開始・再開：To do or not to do? 第38回大阪脳卒中臨床研究会（平成21年2月14日、梅田）

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究

研究分担者 矢坂正弘 九州医療センター 脳血管内科 科長

研究要旨 ワルファリン用量への遺伝子多型（CYP2C9 と VKORC1）と食事の影響を明らかにする目的で、ワルファリン療法中の症例を対象に、遺伝子検査と食事内容の詳細を調べ、それらの個々の症例におけるワルファリン至適用量との関連性を明らかにする。

A. 研究目的

ワルファリン用量の個人差が大きいことから、ワルファリン用量への遺伝子多型（CYP2C9 と VKORC1）と食事の影響を明らかにする。ワルファリン療法の対象である発作性非弁膜性心房細動（PAF）における脳梗塞の重症度を急性脳梗塞連続例を対象にして明らかにする。

B. 研究方法

ワルファリン療法中の症例を対象に、遺伝子検査と食事内容の詳細を調べ、それらの個々の症例におけるワルファリン至適用量との関連性を明らかにする。脳梗塞急性期連続症例における重症度関連因子をPAFを含めて多変量解析する。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守する。

C. 研究結果

当院倫理委員会へ申請し、12月に研究（遺伝子多型と食事調査）施行が認定され、調

査用紙の印刷や遺伝子研究用の採血検査態勢が整った。

PAFを含めた脳梗塞の重症度を急性脳梗塞連続686例で検討した結果、心調律は544例が洞調律、69例がPAF、73例が持続性心房細動で、中等・重症脳梗塞の独立した危険因子として持続性心房細動（OR 2.17, 1.26 - 3.72, $p=0.0049$ ）のみならず、PAF（OR 2.05, 1.21 - 3.48, $p=0.0075$ ）が指摘された。

D. 考察

ワルファリン至適治療用量に関する遺伝子多型と食事の影響に関する研究が当院で遂行する準備が完了した。PAFは脳梗塞の発症率が持続性心房細動と同等であることが警告されてきたが、発症する脳梗塞の重症度も持続性心房細動とともに中等～重症であることが明らかにされた。

E. 結論

ワルファリン至適治療用量に関する遺伝子多型と食事の影響に関する研究準備が整った。PAFは中等症～重症脳梗塞の独立した危険因子である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文 なし

2. 学会発表

第6回国際脳卒中会議、2008年9月24日～27日、ウィーンでPAFが重症脳梗塞の独立した因子であることを発表した。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討に関する研究

研究分担者 是恒之宏 国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター長

研究要旨：ワルファリンの個人差と遺伝子多型の関連性について、最近の報告では CYP2C9、VKORC1 の遺伝子多型、年齢、性別、体重、体表面積等の要因でワルファリン投与量の 60% が説明可能とされた。しかし、残る 40% は説明のつかない部分として残されている。ワルファリンの投与量には食事や他の薬剤の影響が大きいことが以前より知られていることから、季節ごとに食事内容を詳細に検討し遺伝子多型と組み合わせることにより、個別化医療に資するか否かを検討する。本年度は研究計画の立案と院内倫理委員会での承認を得、今後症例集積に努める予定である。

A. 研究目的：

本研究は独立行政法人理化学研究所との共同研究であり、また国内の循環器・脳卒中の基幹的診療施設が参加する多施設共同研究である。具体的には、ワルファリンの至適用量の個人差に CYP2C9 と VKORC1 の遺伝子多型が影響を及ぼすことが近年知られているが、食事から摂取されるビタミン K の影響を加味して検討を加えることにより、ワルファリンの投与量に対する遺伝子、生理的要因、さらに環境要因の与える影響を明らかにし、至適用量のより正確な推定方法の検索を目的とする。

B. 研究方法：

当院に定期的に通院しているワルファリンによる抗凝固療法を受けている患者を対象に、1) 患者本人の文書同意取得後、体重等の背景情報を調査するとともに VKORC1 および CYP2C9 の遺伝子多型検査を

実施する、2) 食事調査票記載時期の PT-INR 検査値を含む血液検査データを収集する、3) 食事調査票を用いてビタミン K を含む各種栄養摂取量（推定値）を収集する。季節変動を調査するため、患者 1 名につき、原則として季節ごとに 4 回食事調査を実施する、4) 食事調査実施時期に合わせて、ビタミン K 血中濃度を測定する（患者 1 名につき 1 回）。評価項目：1) ワルファリン維持投与量（PT-INR が 1.6-2.5 の時のワルファリン投与量）2) イベント（有害事象のうち心筋梗塞、脳卒中、その他の血栓塞栓症などの血栓症イベント、ワルファリン服用の一時中止を必要とする出血をきたした場合の出血性イベント）。解析方法：1) ワルファリン投与量に対する遺伝子多型、ビタミン K 摂取量、季節要因等の影響を多変量回帰モデルにより分析し、ワルファリン維持投与量の予測式を推定する、2) 先行研究におけるワ

ルファリン維持投与量の予測式による値と、本研究の観測値の関連を相関係数等により検討する、3) 食事調査票によるビタミンK摂取量とビタミンK血中濃度の関連を相関係数等により検討する、4) イベント発生に対するCYP2C9、VKORC1等の影響を検討する。目標症例数：研究参加施設通院患者400例。

(倫理面への配慮) 研究計画は倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

本年度は各施設における倫理委員会の承認を得、研究遂行への準備をすすめた。現時点で結果は得られていないが、来年度以降症例の集積に努める。

D. 考察

今後症例の集積を遂行する際、当院ではCRCが自主研究に協力する体制ではないことから、特に食事内容のアンケートに関するフィードバックのあり方について検討する必要があると考えられる。

E. 結論

ワルファリンの至適用量の個人差に遺伝子多型と詳細な食事の内容の関連を検討することは大変有意義であり、来年度以降研究の遂行と成果に期待が持たれる。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Toyoda K, Yasaka M, Iwade K, Nagata

K, Koretsune Y, Sakamoto T, Uchiyama S, Gotoh J, Nagao T, Yamamoto M, Takahashi JC, Minematsu K; Bleeding with Antithrombotic Therapy (BAT) Study Group. Dual antithrombotic therapy increases severe bleeding events in patients with stroke and cardiovascular disease. A prospective, multicenter, observational study. Stroke 2008;39:1740-1745.

2) Yasuoka Y, Naito J, Hirooka K, Chin W, Miyatake K, Kusuoka H, Koretsune Y. Right atrial spontaneous echo contrast indicate high incidence of perfusion defects in pulmonary scintigraphy in patients with atrial fibrillation. Heart and Vessels 2009;24:32-36.

3) Ogawa S, Yamashita T, Yamazaki T, Aizawa Y, Atarashi H, Inoue H, Ohe T, Ohtsu H, Okumura K, Katoh T, Kamakura S, Kumagai K, Kurachi Y, Kodama I, Koretsune Y, Saikawa T, Sakurai M, Sugi K, Tabuchi T, Nakaya H, Nakayama T, Hirai M, Fukatani M, Mitamura H and for the J-RHYTHM Investigators. Optimal treatment strategy for patients with paroxysmal atrial fibrillation. -J-RHYTHM study- Circ J 2009;73:242-248.

2. 学会発表

Koretsune Y, et al. The oral factor Xa inhibitor DU-176b in Japanese warfarin-naïve patients with atrial fibrillation: Results of two phase II