

68	hypothetical protein MTES_3350	<i>Microbacterium testaceum</i>	57/127 (45%)
69	vitamin K epoxide reductase family protein	<i>Micrococcus luteus</i>	61/118 (52%)
70	Vitamin K epoxide reductase family	<i>Microcoleus chthonoplastes</i>	38/137 (28%)
71	conserved hypothetical protein	<i>Mobiluncus curtisii</i>	48/127 (38%)
72	vitamin K epoxide reductase	<i>Mobiluncus mulieris</i>	50/129 (39%)
73	hypothetical protein MAB_3268c	<i>Mycobacterium abscessus</i>	70/112 (63%)
74	integral membrane protein	<i>Mycobacterium avium</i>	77/131 (59%)
75	vitamin K epoxide reductase	<i>Mycobacterium gilvum</i>	79/127 (63%)
76	hypothetical protein MintA_14697	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	73/131 (56%)
77	putative integral membrane protein	<i>Mycobacterium kansasii</i>	72/131 (55%)
78	integral membrane protein	<i>Mycobacterium leprae</i>	67/124 (55%)
79	integral membrane protein	<i>Mycobacterium marinum</i>	72/127 (57%)
80	integral membrane protein	<i>Mycobacterium parascrofulaceum</i>	71/131 (55%)
81	integral membrane protein	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	79/126 (63%)
82	vitamin K epoxide reductase	<i>Mycobacterium sp.</i>	78/127 (62%)
83	conserved integral membrane protein	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	77/126 (62%)
84	integral membrane protein	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	72/127 (57%)
85	vitamin K epoxide reductase	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	80/127 (63%)
86	hypothetical protein nfa52240	<i>Nocardia farcinica</i>	74/131 (57%)
87	vitamin K epoxide reductase	<i>Nocardioides sp.</i>	51/128 (40%)
88	Vitamin K epoxide reductase	<i>Nocardiosis dassonvillei</i>	70/114 (62%)
89	vitamin K epoxide reductase	<i>Nostoc punctiforme</i>	28/87 (33%)
90	conserved membrane hypothetical protein	<i>Oscillatoria sp.</i>	30/103 (30%)
91	Vitamin K epoxide reductase	<i>Oscillochloris trichoides</i>	30/101 (30%)
92	hypothetical protein HMPREF9017_01299	<i>Parascardovia denticolens</i>	52/138 (38%)
93	vitamin K epoxide reductase	<i>Prevotella oralis</i>	34/137 (25%)
94	hypothetical protein RSal33209_3253	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	64/132 (49%)
95	hypothetical protein PBD2.107	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	73/134 (55%)
96	hypothetical protein RHA1_ro07031	<i>Rhodococcus jostii</i>	76/120 (64%)
97	hypothetical membrane protein	<i>Rhodococcus opacus</i>	78/133 (59%)
98	putative Membrane protein	<i>Rothia dentocariosa</i>	57/130 (44%)
99	hypothetical protein HMPREF0733_12075	<i>Rothia dentocariosa</i>	57/130 (44%)
100	predicted membrane protein	<i>Rothia mucilaginoso</i>	56/131 (43%)
101	vitamin K epoxide reductase	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	134/134 (100%)
102	vitamin K epoxide reductase	<i>Salinispora arenicola</i>	86/134 (65%)
103	vitamin K epoxide reductase	<i>Salinispora tropica</i>	81/116 (70%)
104	hypothetical protein Sked_13240	<i>Sanguibacter keddieii</i>	67/134 (50%)
105	hypothetical protein HMPREF9020_01304	<i>Scardovia inopinata</i>	44/122 (37%)
106	hypothetical protein sce9005	<i>Sorangium cellulosum</i>	37/121 (31%)
107	Vitamin K epoxide reductase	<i>Stackebrandtia nassauensis</i>	78/134 (59%)
108	integral membrane protein	<i>Streptomyces albus</i>	65/132 (50%)
109	integral membrane protein	<i>Streptomyces avermitilis</i>	65/133 (49%)
110	integral membrane protein	<i>Streptomyces bingchenggensis</i>	62/135 (46%)
111	Putative integral membrane protein	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	60/132 (46%)
112	integral membrane protein	<i>Streptomyces coelicolor</i>	63/135 (47%)
113	Vitamin K epoxide reductase	<i>Streptomyces flavogriseus</i>	62/131 (48%)
114	integral membrane protein	<i>Streptomyces ghanaensis</i>	68/135 (51%)
115	vitamin K epoxide reductase	<i>Streptomyces griseoflavus</i>	68/135 (51%)
116	putative integral membrane protein	<i>Streptomyces griseus</i>	60/131 (46%)
117	putative Membrane protein	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	61/135 (46%)
118	integral membrane protein	<i>Streptomyces lividans</i>	63/135 (47%)
119	integral membrane protein	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	68/131 (52%)
120	putative integral membrane protein	<i>Streptomyces roseosporus</i>	61/131 (47%)
121	vitamin K epoxide reductase	<i>Streptomyces scabiei</i>	62/131 (48%)
122	Vitamin K epoxide reductase	<i>Streptomyces sp.</i>	69/134 (52%)
123	integral membrane protein	<i>Streptomyces sviceus</i>	68/131 (52%)
124	putative integral membrane protein	<i>Streptomyces tenjimariensis</i>	66/131 (51%)
125	Vitamin K epoxide reductase	<i>Streptomyces violaceusniger</i>	60/135 (45%)
126	integral membrane protein	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	62/135 (46%)
127	membrane protein	<i>Streptosporangium roseum</i>	86/128 (68%)
128	hypothetical protein Saci_1138	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	38/127 (30%)
129	Vitamin K epoxide reductase	<i>Sulfolobus islandicus</i>	23/93 (25%)
130	Vitamin K epoxide reductase	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	30/115 (27%)
131	Vitamin K epoxide reductase family	<i>Synechococcus sp.</i>	30/101 (30%)
132	vitamin K epoxide reductase	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	30/129 (24%)
133	hypothetical protein TWT658	<i>Tropheryma whipplei</i>	52/121 (43%)
134	Vitamin K epoxide reductase	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	58/126 (47%)
135	Vitamin K epoxide reductase	<i>Vulcanisaeta moutnovskia</i>	36/125 (29%)
136	Vitamin K epoxide reductase	<i>Xylanimonas cellulosilytica</i>	55/134 (42%)

厚生労働科学研究費補助金  
(循環器疾患・糖尿病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治療確立に関する研究—

研究分担者 宮田 茂樹 国立循環器病研究センター 臨床検査科・輸血管理室 医長

研究要旨：近年、ワルファリンの標的酵素であるビタミン K エポキシド還元酵素 (VKORC1) がクローニングされ、本酵素の遺伝子多型がワルファリン必要量と関連することが明らかとなった。しかし、代謝酵素 CYP2C9 の遺伝子多型とあわせても、ワルファリン至適投与量の個人差の約 40%程度が遺伝子多型で説明できるに過ぎず、それ以外の因子の解明もワルファリンの個別化医療実施のためには重要となる。今回、遺伝子多型、さらにビタミンK摂取量やその季節変動がワルファリン至適投与量に与える影響について検討する多施設共同前向き観察研究を実施した。結果、328例が登録され、ほぼ全員の観察が終了した。また、全ての症例における VKORC1、CYP2C9 の遺伝子多型の検討が終了した。今回の比較的大規模な検討でも、遺伝子多型の頻度は、従来本邦において報告されている頻度と大きな相違がないことが確認された。回収できた症例データの予備的な解析では、ビタミンK摂取量の季節変動がみられること、ワルファリン至適投与量と eGFR に関連が見られること、ビタミン K1 血中濃度が高いほど PT-INR は低い傾向にあるなど、いくつか興味深い結果が得られた。今後、全症例のデータ固定終了後、遺伝子多型の関与やそれ以外の因子のワルファリン至適投与量に与える影響について解析を進める。これらの結果は、本邦におけるワルファリンの個別化医療実施における重要なデータとなると考えられる。

A. 研究目的

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。個人に適した治療を目指した研究が進められ、特に遺伝子型に基づいた薬物療法の選択や投薬量の調整が行われようとしている。このファーマコゲノミクスの最先端をいくのがワルファリンと遺伝子型の研究である。ワルファリン投与患者では、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) 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、ワルファリンにおいて至適投与量に大きな個人差があることが知られている。ワルファリンの標的酵素であるビタミン K エポキシド還元酵素 (vitamin K epoxide reductase complex subunit 1:VKORC1) がクローニングされ、本酵素の遺伝子多型がワルファリン至適投与量と関連することが明らかとなった。

しかし、代謝酵素 CYP2C9 の遺伝子多型とあわせても、ワルファリン至適投与量の個人差の約 40%程度が遺伝子多型にて説明できるに過ぎず、それ以外の因子の説明もワルファリンの個別化医療実施のためには重要となる。本研究では、遺伝子多型、さらにビタミンK摂取量やその季節変動がワルファリン至適投与量に与える影響について検討する多施設共同前向き観察研究を実施した。遺伝子多型やビタミンK摂取量などワルファリン至適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している。

## 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、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した。患者本人の文書同意取得後、年齢、性別、身長、体重、基礎疾患等の背景情報を調査するとともに VKORC1、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（推測値）を収集するとともに、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検討した。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回食事調査を実施した。また、食事調査実施時期に合わせて、ビタミンK血中濃度を測定した（患者1名につき1回

のみ）。

（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。

## C. 研究結果

4施設（国立循環器病研究センター、大阪医療センター、九州医療センター、聖マリアンナ医科大学）にて、2010年2月の登録期限までに328例が登録された。うち、71例が観察期間中に中止された。主な中止理由は、同意撤回（56例）、追跡不能（4例）、有害事象の発現または死亡（5例）であった。また、2011年2月末現在で調査中の症例が3例あった。回収できた症例データを予備的に解析した。男性が236例（73%）、年齢は25歳から92歳までで中央値が72歳、84%がワルファリン服薬を開始して1年以上経過していた。また、ワルファリンの服薬理由として、心房細動が79%、血栓塞栓症が77%（複数回答可）であった。症例全体では、

PT-INR やワルファリン服薬量の季節変動は大きくないようであった。一方、ビタミンK摂取量（食事アンケートによる）は、夏に少なく、冬に多い傾向がみられた。ビタミンK1 血中濃度が高いほどPT-INR は低い傾向にあった。しかし、ビタミンKの血中濃度と摂取量の関連があまり強くないことから、食事アンケートによる調査結果の精度については、今後注意深い検討が必要と思われる。また、単施設でのパイロット研究と同様、ワルファリン投与量と eGFR（推算糸球体濾過量）、年齢、体表面積は関連があると思われる、ワルファリンの効果に腎機能が影響している可能性が高い。さらに、全ての症例における VKORC1、CYP2C9 の遺伝子多型の検討が終了した（表 1 参照）。日本人の約 78% は同一の遺伝子型（VKORC1 A/A と CYP2C9\*1/\*1）を保有しており、日本人のワルファリン至適投与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（約 1.5%）ながらも、大量のワルファリンを必要とすると考えられる症例（VKORC1 G/G と CYP2C9\*1/\*1 を持つ）も存在する。反対に、VKORC1 A/A と CYP2C9\*1/\*3 の保有者（約 3.8%）は、少ないワルファリン量で維持できると考えられる。このような患者では、過剰投与により出血が起こらないような注意が必要であると思われる。今後、遺伝子多型や他の環境要因、ビタミンK摂取量が極端に多いまたは少ない症例での検討等、ワルファリン至適投与量に関与する因子について、さらに詳細な検討を実施していく。

表 1. Results of genotyping of CYP2C9 and VKORC1

遺伝子多型		VKORC1 (-1639G>A)		
		AA	AG	GG
CYP2C9	*1/*1	78.1%	15.1%	1.5%
	*1/*3	3.8%	1.0%	0.5%
	*3/*3	0%	0%	0%

#### D. 考察

4 施設の協力のもと、328 例の症例登録が完了した。全症例の調査が完了していないため、遺伝子多型と他の臨床データのマッチングができない状況で、予備的解析のみ行ったが、過去に実施した単施設パイロット研究の結果との一致や、季節変動についてなど興味深い結果が得られた。今後、全症例の調査完了後、データマネジメントによるデータクリーニング、データ固定を経て、統計家による詳細な解析を実施する。

#### E. 結論

今回の比較的大規模な検討においても、遺伝子多型の頻度は、従来本邦において報告されている頻度と大きな相違がないことが確認された。終了した症例のみで行った予備的な解析では、ビタミンK摂取量の季節変動がみられること、ワルファリン至適投与量と eGFR に関連が見られること、ビタミンK1 血中濃度が高いほどPT-INR は低い傾向にあるなど、いくつか興味深い結果が得られた。今後、全てのデータ固定後、遺伝子多型の関与やそれ以外の因子のワルファリン至適投与量に与える影響についてさらに解析を進める。これらの結果は、本邦におけるワルファ

リンの個別化医療実施における重要なデータとなると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

Tanaka T; Yamamoto H, Kada A, Ura T, Ohata N, Miyata S, Miyata T, Nagatsuka K: Influence of renal impairment and genetic subtypes to warfarin control. XIX. European Stroke Conference, 25-28 May, 2010, Barcelona, Spain

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究協力者

国立循環器病研究センター 臨床検査部  
藤野正裕、太田直孝、藤山啓美、佐野道孝

厚生労働科学研究費補助金  
(循環器疾患・糖尿病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 神出 計 大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学 講師

研究要旨：Regulator of G protein signaling 2 (RGS2) 遺伝子の多型が高血圧と関連することも報告され、ヒトにおいて血圧調節に関わると考えられている。RGS2 はアンジオテンシンⅡやエンドセリンなどのシグナル情報伝達を抑制する蛋白であるため、その機能が低下した場合には高血圧のみならず動脈硬化など進行しやすい可能性がある。今回、RGS2 遺伝子多型と頸動脈硬化の関連性を高血圧患者ならびに一般住民を対象にして検討したところ、イントロンに存在する二つの多型 1026T>A, 1891-1892delTC が有意な関連性を示した。したがってこれらの多型は日本人頸動脈硬化の遺伝素因である可能性が示唆された。

A. 研究目的

アンジオテンシンⅡなど G 蛋白共役型受容体を介してシグナル伝達がなされる高血圧関連の血管作動物質は多い。

Regulator of G protein signaling 2 (RGS2) は欧米の複数このような受容体からのシグナルを減弱させる分子として同定された。RGS2 遺伝子の欠損マウスは非常に血圧が上昇することから RGS2 遺伝子は血圧調節の key molecule と考えられている。過去の我々の検討において RGS2 遺伝子の遺伝子多型が高血圧と関連することが報告され、ヒトにおいて血圧調節に関わると考えられている。RGS2 はアンジオテンシンⅡやエンドセリンなどのシグナル情報伝達を抑制する蛋白であるため、その機能が低下した場合には高血圧のみならず動脈硬化など進行しやすい可能性がある。本 RGS2 遺伝子多型は降圧薬の降

圧効果に関連することも我々が明らかにしている。今回はヒト RGS2 遺伝子多型と動脈硬化の関連性につき検討した。

B. 研究方法

対象は国立循環器病研究センター高血圧・腎臓内科に通院中の高血圧患者 841 名と同循環器病予防検診部で行っている循環器病コホート研究、吹田研究に参加している 1770 名を対象とした。全例頸動脈エコーにより内中膜肥厚 (mean-IMT:m-IMT) と最大径 IMT (max-IMT:M-IMT) を測定している。血圧、血清脂質、血糖値などの測定を行い、文書によるインフォームドコンセントを取った後 DNA 採血を行った。RGS2 遺伝子のプロモーターにある -638A>G, ならびにイントロンの多型 1026T>A, 1891-1892delTC を解析に用い

た。これら3つもSNPは同じハプロタイプ内に存在し、お互いリンクしている。統計解析は主にJMP ver 4, SAS ver8.2を用いて行った。

(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17年改正 文部科学省・厚生労働省・経済産業省)を遵守する。

C. 研究結果

高血圧患者において1026T>A, 1891-1892delTCはm-IMT>1.0以上を示す頸動脈硬化の肥厚に有意に関連し、M-IMT>1.0を指標にした動脈硬化では高血圧患者・一般住民両群で有意に関連した。さらに65歳未満の一般住民で両SNPはさらに強くM-IMTの肥厚に関与した。ロジスティック回帰によって交絡因子を補正後もこれらの関連性は確認された。

(表)

表

SNP	Genotype group	The hypertensive subjects						The general population			
		M-IMT		m-IMT		Total		M-IMT		age <65	
		Odds ratio (95% CI)	P	Odds ratio (95% CI)	P	Odds ratio (95% CI)	P	Odds ratio (95% CI)	P	Odds ratio (95% CI)	P
-538A>G	AA	1	0.24	1	0.29	1	0.05	1	1	0.01	
	AG+GG	1.27 (0.85-1.90)		1.21 (0.86-1.70)		1.33 (0.99-1.78)		1.55 (1.11-2.19)			
1026T>A	TT	1	0.22	1	0.03	1	0.07	1	1	0.007	
	TA+AA	1.27 (0.86-1.87)		1.42 (1.05-1.97)		1.30 (0.98-1.71)		1.56 (1.13-2.15)			
1891-1892delTC	1	1	0.21	1	0.03	1	0.048	1	1	0.002	
	1d00	1.28 (0.87-1.81)		1.44 (1.04-2.01)		1.32 (1.00-1.74)		1.59 (1.16-2.21)			

D. 考察

RGS2遺伝子多型1026T>A, 1891-1892delTCは日本人の頸動脈硬化に関連する。これらの多型は日本人の高血圧発症にも関与している多型であるため、これらの多型のリスクアレルを有する高血圧患者のより厳格な降圧を行い動脈硬化の進展を抑制するような遺伝子情

報を基にしたテーラーメイド診療が将来可能となるかもしれない。

E. 結論

RGS2遺伝子多型1026T>A, 1891-1892delTCは日本人の頸動脈硬化の遺伝的素因である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kamide K, Kokubo Y, Yang J, Takiuchi S, Horio T, Matsumoto S, Banno M, Matayoshi T, Yasuda H, Miwa Y, Yoshihara F, Nakamura S, Nakahama H, Iwashima Y, Oguro R, Ohishi M, Rakugi H, Okamura T, Miyata T, Kawano Y. Association of intima-media thickening of carotid artery with genetic polymorphisms of the regulator of G-protein signaling 2 gene in patients with hypertension and in the general population. Hypertens Res 2011 (in press)

2) Iwamoto Y, Ohishi M, Yuan M, Tatara Y, Kato N, Takeya Y, Onishi M, Maekawa Y, Kamide K, Rakugi H.

$\beta$ -Adrenergic receptor gene polymorphism is a genetic risk factor for cardiovascular disease: a cohort study with hypertensive patients. Hypertens Res 2011 (in press)

3) Sugimoto K, Katsuya T, Kamide K, Fujisawa T, Shimaoka I, Ohishi M,

Morishita R, Ogihara T, Rakugi H.  
Promoter polymorphism of RGS2 gene is associated with change of blood pressure in subjects with antihypertensive treatment: the Azelnidipine and Temocapril in hypertensive patients with type 2 diabetes study.

Int J Hypertens 196307: 2010.

4) Matsumoto S, Kamide K, Banno F, Inoue N, Mochizuki N, Kawano Y, Miyata T.

Impact of *RGS2* deficiency on therapeutic effect of telmisartan in angiotensin II-induced aortic aneurysm. Hypertens Res, 33,1244-1249, 2010.

## 2. 学会発表

1) 神出 計、楽木宏実：ポストGWAS時代の薬理遺伝学研究：テーラーメイド医療の可能性 第33回日本高血圧学会総会高血圧関連疾患モデル学会合同シンポジウム

平成22年10月15日 福岡

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・糖尿病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治療確立に関する研究—

研究分担者 鎌倉 史郎 国立循環器病研究センター 心臓血管内科 部長

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た。国立循環器病研究センターでは2008年10月25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。症例登録期間は当初2009年11月末としていたが、目標登録症例数に満たないことから2010年2月末まで延長した。国立循環器病研究センター心臓内科では2010年1月29日までに27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完了した。

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。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。

#### C. 研究結果

国立循環器病研究センターでは2008年10月25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。心臓内科の症例は先行研究には入っていないため、全例が新規症例であった。新規患者の登録が進まなかったため登録期間を2010年2月末まで延長し、2010年1月29日までに心臓内科では27例が登録された。食事調査票の回収とビタミンKの採血は全て順調に終了し、データ固定も完了した。

#### D. 考察

心臓内科では先行研究には参加しておらず、全例が新規症例であったため、理解を得るのに時間がかかり、同意の取れない例もみられた。1月29日までに27例が新規登録され、登録例の脱落を防ぐため参加者に研究意義の理解を深めてもらうため、十分な説明を行いデータ回収は無事終了した。

#### E. 結論

新規登録のため症例を増やすのに時間がかかったが、研究計画通りに完了した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Makimoto H, Nakagawa E, Takaki H, Yamada Y, Okamura H, Noda T, Satomi K, Suyama K, Aihara N, Kurita T, Kamakura S, Shimizu W. Augmented ST-segment elevation during recovery from exercise predicts cardiac events in patients with Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 56:1576-84, 2010.

2) Nagaoka I, Shimizu W, Mizusawa Y, Sakaguchi T, Itoh H, Ohno S, Makiyama T, Yamagata K, Makimoto H, Miyamoto Y, Kamakura S, Horie M. Heart rate-dependent variability of cardiac events in type 2 congenital long-QT syndrome. *Europace* 12:1623-9, 2010.

3) Kawata H, Noda T, Kurita T, Yamagata K, Yamada Y, Okamura H, Satomi K, Shimizu W, Suyama K, Aihara N, Isobe M, Kamakura S. Clinical effect of implantable cardioverter defibrillator replacements: when should you resume driving after an implantable cardioverter defibrillator replacement? *Circ J* 74:2301-7, 2010.

4) Takigawa M, Noda T, Kurita T, Aihara N, Yamada Y, Okamura H, Satomi K, Suyama K, Shimizu W, Kamakura S. Predictors of

electrical storm in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy--how to stratify the risk of electrical storm. *Circ J* 74:1822-9, 2010.

5) Nishizaki M, Sugi K, Izumida N, Kamakura S, Aihara N, Aonuma K; Atarashi H, Takagi M, Nakazawa K, Yokoyama Y, Kaneko M, Suto J, Saikawa T, Okamoto N, Ogawa S, Hiraoka M; Investigators of the Japan Idiopathic Ventricular Fibrillation Study; Subgroup of the Japanese Society of Electrocardiology. Classification and assessment of computerized diagnostic criteria for Brugada-type electrocardiograms. *Heart Rhythm* 7:1660-6, 2010.

## 2. 学会発表

1) Kamakura T, Kawata H, Yamada Y, Okamura H, Noda T, Aiba T, Satomi K, Shimizu W, Aihara N, Kamakura S: Patients with non-type 1 Brugada-pattern ECGs show clinical profiles similar to Brugada syndrome in the inferolateral early repolarization syndrome. AHA2010 (2010. Nov 13-17, Chicago)

2) 鎌倉令, 山田優子, 岡村英夫, 野田崇, 相庭武司, 里見和浩, 須山和弘, 清水渉, 相原直彦, 鎌倉史郎, 上野和行. 不整脈例におけるベプリジルの至適投与量と血中濃度. 第27回日本心電学会学術集会. 大分, 2010

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・糖尿病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 ユニットリーダー

研究要旨：理化学研究所オミックス基盤研究領域は GODWARD 研究において、簡便かつ迅速である SmartAmp 法を用いてワルファリン投与量に関連する SNP 診断系の開発と応用を行い、成功させた。SmartAmp 法は、迅速な DNA と RNA 検出、またリアルタイムモニタリングにおいて 30 分以内にターゲットを検出する SNP 遺伝子タイピングに基づいた DNA 増幅法である。本研究チームの主要論文 (Lezhava 他、Human Mutation 誌 2010) 発表後、本研究は分析を最適化・簡素化するため SmartAmp 法の技術開発を中心に行った。結果、Exciton Primer はモニタリングにおいて、Exciton Primer を使用すると SYBRGreenI と比べ、よりよい結果がみられた。また Exciton Primer は標識されるとその相補鎖へのみシグナルを発するので、より強い特異性を示した。SNP 分析の最適化において 1 チューブでの二色反応は反応の質が格段に上がり、また、作業時間の短縮・対費用効果を向上させた。医療現場においてもワルファリンを投与する際の事前検査としての導入が可能である。

A. 研究目的

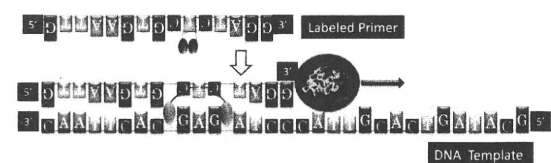
簡便かつ迅速である SmartAmp 法を用いてワルファリン投与量に関連する SNP 診断系の開発と応用を目指す。

B. 研究方法

遺伝子タイピング分析はリアルタイムモニタリングで SYBRGreenI を検出試薬として開発されている。さらに、Exciton Primer の開発により高い特異性において分析が可能となった。Exciton Primer は相補型の配列に結合するが、SYBRGreenI は合成された全ての二本鎖の DNA と結合し、特定されない二本鎖にさえもシグナルを与えてしまう。Exciton Primer のメ

カニズムは図 1 参照。

図 1



また、SNP 遺伝子タイピングにおける多色反応の改良に関しても研究を進めた。ここで特に留意したのが、最も普及している波長で検出できる色素を使用すること、FAM や ROX フィルターを備える市販の機器での検出が可能であることという点である。これは国内外の研究機関に取り入れてもらうための重要なステップであ

った。最も良い組み合わせにするために、色素の数を選抜して、最も適当なものを選択した。チアゾールオレンジ (510/530nm) とチアゾールピンク (570/590nm) である。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子多型同定法の開発に関する研究なので倫理面の問題がない。

### C. 研究結果

VKORC1 と CYP2C9 SNPs genotyping の最適化分析を 1 チューブで行えるというのは、反応にかかる費用を大幅に節約することができ、また作業時間の短縮も可能とした。さらに、分析の精度も改良された。1 チューブにおける SNP 検出の新しい方法はバックグラウンドの抑圧に優れていた (図 2 参照)。本研究ワルファリン SNP 遺伝子タイピングの改良は Golden Helix Symposia2010 において、その成果を発表した。携帯用の Tube スキャナを使用し、DNA と血液サンプルの両方を用いて新しい方法を試した。我々の開発した SNP タイピングシステムは医師が診察等の医療現場で使用することができる理想の技術であると確信している。

図 2

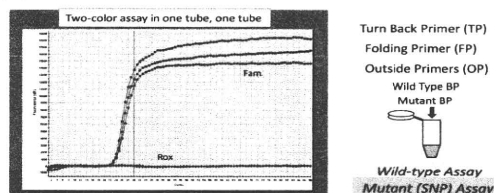


Fig 2 Genotyping of CYP2C9\*3 using wild type template. Only Wild Type primer signal elevates (FAM). Background amplification (ROX) is totally suppressed.

簡便かつ対費用効果の高い結果が患者に 30 分以内に提供することが可能で、さらにその間にワルファリン投与の適量を検

出することができる。ワルファリン投与量に関連する改良技術については 2011 年に行われた International Drug Development and Therapy Conference in Dubai にて発表済みである。

### D. 考察

既に述べたように Exciton Primer を SmartAmp 法に導入することに成功した。波長の異なる複数の蛍光物質を用いて、1 チューブ内で複数の遺伝子を同時に増幅することのできる、マルチプレックスシステムの開発を行ったが、これに関しては VKORC1 を除き、鋳型をヘテロとした時の増幅に若干不安定性が残るため、今後検討の余地を残した。また残念ながら、CYP2C9\*2 及び CYP2C9\*3 に関しては、ヘテロ型及び野生型の血液が非常に稀少であり、鋳型を血液とした時の検討が困難であるため、後は医療機関の協力を得て検体の入手に努めることとしたい。

### E. 結論

簡便かつ迅速である SmartAmp 法を用い、ワルファリン投与量に関連する SNP 診断系において Exciton Primer を用い、開発と応用を成功させた。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

1. 論文発表：なし

2. 学会発表：

1) Lezhava, A. (Invited Speaker)  
Two-Color SNP genotyping of genes

involved in Warfarin Dose Adjustment.  
Golden Helix Symposia 2010; 1st  
December - 4th December, Athens, Greece  
2) Lezhava, A. (Invited Speaker)  
Rapid Detection of Clinically  
Important SNPs and Mutations by  
Two-color SmartAmp Method  
3rd International Conference on Drug  
Discovery & Therapy;  
7th February - 10th February 2011,  
Dubai, UAE

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・糖尿病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 国立循環器病研究センター 脳血管内科 医長

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た。国立循環器病研究センターでは2008年10月25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。症例登録期間は当初2009年11月末としていたが、目標登録症例数に満たないことから2010年2月末まで延長した。国立循環器病研究センター脳内科では2010年1月19日までに152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完了した。

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。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。

#### C. 研究結果

国立循環器病研究センターでは2008年10月25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、初期の登録は順調であったが、新規患者の登録が進まなかったため登録期間を2010年2月末まで延長し、2010年1月29日までに脳内科では152例が登録された。国立循環器病研究センターでの食事調査票の回収とビタミンKの採血は全て順調に終了し、データ固定も終了している。

#### D. 考察

脳内科では先行研究を行っていたため、当初の登録例については問題なかったが、新規症例の登録が進まなかった。最終的には1月29日までに27例が新規登録され、登録例の脱落を防ぐため参加者に研究意義の理解を深めてもらうため、十分な説明を行いデータ回収は無事終了した。

#### E. 結論

新規登録のため症例を増やすのに時間

がかかったが、研究計画通りに完了した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### 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・糖尿病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に関する研究—

研究分担者 矢坂 正弘 国立病院機構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。ワルファリンの脳出血への影響を調べる。

(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

当院倫理委員会通過後、30名を登録し

遺伝子検査とビタミンK採血を行った。食事調査を各季節毎に行った。ワルファリン療法中の脳出血は血腫が大きく、予後不良。その是正に第IX因子複合体が有用。

D. 考察・結論

研究は順調に進めることができた。ワルファリン療法の血腫増大作用とPT-INR緊急是正法の有用性を報告した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kuwashiro T, Yasaka M, et al: Enlargement of acute intracerebral hematomas in patients on long-term warfarin treatment. *Cerebrovasc Dis* 29:446-453, 2010.

2. 学会発表

1) 矢坂正弘：心原性脳塞栓症の病態と治療 日本集中治療学会 23年2月25日、

横浜

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・糖尿病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：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25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。症例登録期間は当初2009年11月末としていたが、目標登録症例数に満たないことから2010年2月末まで延長した。国立病院機構大阪医療センターでは2009年11月30日までに50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完了した。

#### 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

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。

#### C. 研究結果

本年度は当院において同意の得られた50例に対し、食事アンケートについて季節ごとの集積を得た。全症例において遺伝子多型、ビタミンK測定の採血、食事アンケートの回収とデータ入力固定を完了した。

#### D. 考察

研究費による研究補助員により、スケジュール管理や食事内容のアンケートに関するフィードバックも行なうことができた。データの欠損はほぼ生じることなく概ね良好にデータ集積が可能であった。

#### 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、研究の成果に期待が持たれる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Shinohara Y, Katayama Y, Uchiyama S, Yamaguchi T, Handa S, Matsuoka K, Ohashi Y, Tanahashi N, Yamamoto H, Genka C, Kitagawa Y, Kusuoka H, Nishimaru K, Tsushima M, Koretsune Y, Sawada T, Hamada C, for the CSPS 2 group. Cilostazol for prevention of secondary stroke (CSPS 2): an aspirin-controlled, double-blind, randomized non-inferiority trial. *Lancet Neurol* 9(10):959-68, 2010.

2) Toyoda K, Yasaka M, Uchiyama S, Nagao T, Gotoh J, Nagata K, Koretsune Y, Sakamoto T, Iwade K, Yamamoto M, Takahashi J, Minematsu K. and on behalf of The Bleeding With Antithrombotic Therapy (BAT) Study Group Blood Pressure Levels and Bleeding Events During Anti-thrombotic Therapy. *The BAT Study. Stroke* 41: 1440-1444, 2010.

3) Inoue H, Nozawa T, Hirai T, Goto S, Origasa H, Shimada K, Uchiyama S, Hirabayashi T, Koretsune Y, Ono S, Hasegawa T, Sasagawa Y, Kaneko Y, Ikeda Y. Sex-Related Differences in the Risk Factor Profile and Medications of Patients With Atrial Fibrillation Recruited in J-TRACE *Circ J* 74(4): 650-654, 2010.

##### 2. 学会発表

1) Koretsune Y. Current Status and Prospects for the treatment of Atrial Fibrillation XXth World Congress of