

Table 2. Extracted 7 SNPs with $q < 1$ for the second dataset.

RS number	Allele	MAF	SNP function		Chr	Position ^a	Associated gene symbol	For second dataset		Two stages of screening	
			Type	Location				p_F	q_{BH}	p_{per}	p_{per}
rs9351963	A/C	0.328	cSNP	intron	6	73749861	KCNQ5	3.31E-05	0.173	*	0.0289
rs11022922	C/T	0.376	cSNP	intron	14	63472498	KCNH5	3.21E-04	0.802		1.0000
rs3918305	A/G	0.402	cSNP	intron	12	109331162	SVOP	6.21E-04	0.802		1.0000
rs3813627	G/T	0.435	cSNP	NearGene-5	1	161195148	TOMM40L	7.62E-04	0.802		1.0000
rs768172	A/T	0.441	cSNP	intron	7	95805703	SLC25A13	7.87E-04	0.802		1.0000
rs3813628	A/C	0.436	cSNP	5'UTR	1	161196166	TOMM40L	1.02E-03	0.802		1.0000
rs10815019	A/G	0.222	cSNP	intron	9	4547288	SLC1A1	1.20E-03	0.802		1.0000

RS number: reference SNP identification number in dbSNP. MAF: minor allele frequency. Chr: chromosome number, i.e., a position in human genome GRCh37.p10 build 104. p_F : indicates a p value calculated using Fisher's exact test, q_{BH} : indicates adjusted p_F value by the Benjamini-Hochberg method, p_{per} : indicates p values adjusted using a permutation test for multiple testing problems, * indicates $p_{per} < 0.05$. NearGene-5 indicates that the SNP is within 2 kb upstream of a gene.
doi:10.1371/journal.pone.0105160.t002

candidate SNPs to 6,506 from 109,365. Approximately 80,000 SNPs can be extracted without knowledge-based reduction of the SNP number. Thus, statistically significant SNPs cannot be extracted from the present data. We could find the statistically significant rs9351963 in *KCNQ5* by applying the combined method to hypothesis-free genomic data.

The *KCNQ/K(v)7* potassium channel family consists of 5 members of neural muscarine channel (M channel; from *KCNQ1* to *KCNQ5*) which have a distinct expression pattern and a functional role. Although *KCNQ1* is prevalently expressed in the cardiac muscle, *KCNQ2*, *KCNQ3*, *KCNQ4*, and *KCNQ5* are expressed in neural tissue [73–75]. On the other hand, a recent study revealed that *KCNQ4* and *KCNQ5* are the most abundantly expressed *KCNQ* channels in smooth muscle throughout the gastrointestinal tract [76]. Furthermore, Jepps et al. opined that drugs that selectively block *KCNQ4/KCNQ5* might be promising as therapeutics for the treatment of motility disorders such as constipation associated with irritable bowel syndrome [76]. In other words, drugs that selectively open *KCNQ4/KCNQ5* might be effective against diarrhea. The *KCNQ* family gene products assemble as homomeric or heteromeric tetramers to form functional channels that mediate the M-current [77], a current that is suppressed by mAChR activation [78,79]. Irinotecan induces adverse cholinergic effects (acetylcholinergic actions) by inhibiting AChE and binding to mAChR [37,38,80]. Therefore, polymorphisms of *KCNQ5* genes possibly effect incidence of diarrhea as interindividual variation in the drug response among cancer patients treated with irinotecan chemotherapy.

In the present study, only the highest grade of adverse events is recorded during the first 2 months of irinotecan treatment for each patient and each adverse effect. Therefore, incidence of grade ≥ 2 diarrhea possibly includes cases caused partially by enterohepatic circulation of APC and NPC, but genotype of rs9351963 in *KCNQ5* correlates with the start date of treatment with anti-diarrheal agents (Spearman's rank correlation coefficient $\rho = -0.198$, $p = 0.00995$). In other words, genotype of rs9351963 may correlates with the diagnosis (or presentiment) of irinotecan induced early-onset diarrhea (diagnosis is made by trained chemotherapists).

The rs9351963 A>C polymorphism is located in an intron, which does not change the amino acid sequence of the protein and may not influence the biological function of the protein itself. Nonetheless, some intronic polymorphisms are effective markers: For example, rs2237892 in intron 15 of *KCNQ1* is associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus in Japanese individuals [81], and the CA simple sequence repeat in intron 1 (CA-SSR1) of the gene of epidermal growth factor receptor (*EGFR*) is associated with the clinical outcome in gefitinib-treated Japanese patients with non-small cell lung cancer [82]. Furthermore, variations related to intronic or synonymous SNPs possibly affect mRNA stability, translational kinetics, and splicing, resulting in alterations at the protein level, e.g., changes of structure or function [83–89]. Although rs9351963 does not have a known function, this SNP is a possible predictive factor of adverse effects of irinotecan-based chemotherapy and is possibly linked to some functional polymorphisms in *KCNQ5*. Their clinical importance needs to be further elucidated.

In the present study, we extracted rs9351963, which showed a p value (0.0289) obtained using a combination of 2 stages of screening and a permutation test from SNPs selected by KB-SNP. In the second dataset, the p value of Fisher's exact test was 3.31×10^{-5} , and the q value was 0.173 calculated by correction of Benjamini-Hochberg method, as shown in Table 2. This value is

A Irinotecan monotherapy

rs9351963	Diarrhea	
	Grade < 2	Grade ≥ 2
A	63	11
C	15	17

OR (95%CI): 6.3 (2.3-19)
 $p = 8.86 \times 10^{-5}$

rs9351963	Diarrhea	
	Grade < 2	Grade ≥ 2
AA	26	1
AC+CC	13	13

OR (95%CI): 24 (3.1-1139)
 $p = 1.29 \times 10^{-4}$

rs9351963	Diarrhea	
	Grade < 2	Grade ≥ 2
AA+AC	37	10
CC	2	4

OR (95%CI): 7.0 (0.87-89)
 $p = 0.0358$

B Any irinotecan chemotherapy (including irinotecan monotherapy)

rs9351963	Diarrhea	
	Grade < 2	Grade ≥ 2
A	192	33
C	72	39

OR (95%CI): 3.1 (1.8-5.6)
 $p = 3.31 \times 10^{-5}$

rs9351963	Diarrhea	
	Grade < 2	Grade ≥ 2
AA	69	9
AC+CC	63	27

OR (95%CI): 3.3 (1.4-8.5)
 $p = 4.44 \times 10^{-3}$

rs9351963	Diarrhea	
	Grade < 2	Grade ≥ 2
AA+AC	123	24
CC	9	12

OR (95%CI): 6.7 (2.3-20)
 $p = 1.28 \times 10^{-4}$

C Irinotecan combination chemotherapy (excluding irinotecan monotherapy)

rs9351963	Diarrhea	
	Grade < 2	Grade ≥ 2
A	129	22
C	57	22

OR (95%CI): 2.3 (1.1-4.7)
 $p = 0.0211$

rs9351963	Diarrhea	
	Grade < 2	Grade ≥ 2
AA	43	8
AC+CC	50	14

OR (95%CI): 1.5 (0.53-4.5)
 $p = 0.478$

rs9351963	Diarrhea	
	Grade < 2	Grade ≥ 2
AA+AC	86	14
CC	7	8

OR (95%CI): 6.9 (1.9-26)
 $p = 1.44 \times 10^{-3}$

Figure 3. Contingency tables for rs9351963 in *KCNQ5* for each model using each dataset. (A) irinotecan monotherapy (first dataset), (B) any irinotecan chemotherapy (including irinotecan monotherapy; second dataset), and (C) irinotecan combination chemotherapy (excluding irinotecan monotherapy). OR: odds ratio. The p values were calculated using Fisher's exact test. CI: confidence interval. doi:10.1371/journal.pone.0105160.g003

statistically insignificant. Therefore, during the 2 stages of screening, it is statistically sufficient to extract rs9351963.

The calculation of probability of occurrence in Bernoulli trials is suitable to for estimation of validity of the repetition number in the permutation process. In this trial, occurrence probability is defined as $nC_k \times (p_B)^k \times (1 - p_B)^{(n-k)}$, where k is the occurrence number, n is the repetition number, and p_B represents probability. If the repetition number is 100,000 for rs9351963 ($p = 0.02891$ [2891/100000]) and the significance level of the test (α) is 0.05, the occurrence probability is ${}_{100000}C_{2891} \times (0.05)^{2891} \times (1-0.05)^{(100000-2891)} = 4.89 \times 10^{-241}$. In statistics, the 99% (or 95%) confidence interval should be considered. The significance level of $\alpha = 0.05$ does not exist in the 99% confidence interval of the p value for rs9351963, because the occurrence probability 4.89×10^{-241} is clearly lower than 0.01. Similarly, if the repetition number is 10,000, the occurrence probability is 3.41×10^{-26} . This way, the occurrence probability is sufficiently low for 10,000 permutations. Nevertheless, we conducted 100,000 permutations to estimate p values more accurately for the permutation test.

Using our combined method involving KB-SNP, we identified rs9351963 as a potential predictive factor of diarrhea in cancer patients treated with irinotecan chemotherapy; however, the comprehensiveness of KB-SNP was limited. Therefore, statistical information regarding the adverse effects of cancer patients treated with irinotecan chemotherapy is shown in Table S3 for incidence of diarrhea ($p < 0.05$) and in Table S4 for incidence of neutropenia ($p < 0.05$). The relevant data are also provided on the website

Genome Medicine Database of Japan (GeMDBJ) [90] (<https://gemdbj.nibio.go.jp/>). These data will be useful for replication studies or meta-analyses in the future.

In conclusion, in the present study, we applied the combined method to hypothesis-free genomic data on cancer patients treated with irinotecan chemotherapy. By means of this method, rs9351963 in *KCNQ5* was extracted as a candidate SNP related to the incidence of diarrhea. For example, the association of rs9351963 with irinotecan-related diarrhea (OR of 3.14) showed a p value of 3.31×10^{-5} in Fisher's exact test (allele model). Even if this p value were adjusted by means of the permutation test for the effects of multiple testing problems, the adjusted p value would still indicate statistical significance (adjusted p value of $0.0289 < 0.05$). Additionally, we evaluated the performance of rs9351963 using multiple regression models. rs9351963 was clearly superior to clinical parameters (or environmental factors) and showed a sensitivity of 77.8% and specificity of 57.6% in the multiple regression model, including rs9351963. Recent studies showed that the *KCNQ4* and *KCNQ5* genes encode components of the M channel expressed in gastrointestinal smooth muscles and suggested that these genes are associated with irritable bowel syndrome and similar peristalsis diseases. These results suggest that rs9351963 may be a predictive factor of diarrhea in cancer patients treated with irinotecan chemotherapy. This SNP may also be useful for selection of chemotherapy regimens, such as irinotecan monotherapy or a combination of irinotecan chemo-

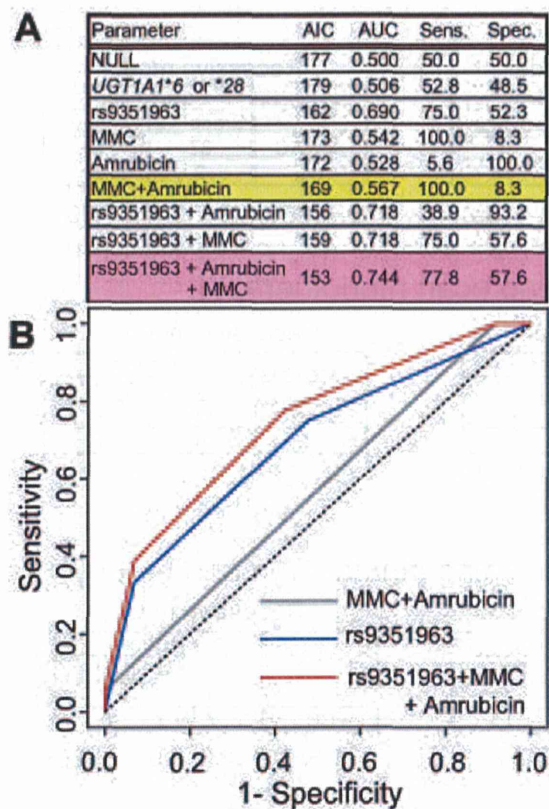


Figure 4. Comparison of AIC, AUC, and ROC curves for logistic regression models. (A) Parameters of each model. (B) The ROC curve of a model consisting of rs9351963+MMC+ Amrubicin. ROC: receiver operating characteristic, AUC: area under the ROC curve, NULL indicates the model without parameters. Each genetic factor conforms to the proportional odds model, AIC: Akaike's information criterion, AUC: area under the ROC curve, Sens.: Sensitivity (%), Spec.: Specificity (%). doi:10.1371/journal.pone.0105160.g004

therapy with KCNQ5 opener. Furthermore, the result of the present analysis supports usability of our combined method.

Supporting Information

Table S1 Irinotecan-treated cancer patients, genetic factor, and clinical parameters for incidence of diarrhea

References

- Evans WE, McLeod HL (2003) Pharmacogenomics—drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 348: 538–549.
- Ingelman-Sundberg M (2008) Pharmacogenomic biomarkers for prediction of severe adverse drug reactions. *N Engl J Med* 358: 637–639.
- Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, et al. (2000) Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* 60: 6921–6926.
- Ma F, Sun T, Shi Y, Yu D, Tan W, et al. (2009) Polymorphisms of *EGFR* predict clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with Gefitinib. *Lung Cancer* 66: 114–119.
- Minami H, Sai K, Sasaki M, Saito Y, Ozawa S, et al. (2007) Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and *UGT1A* genetic polymorphisms in Japanese: roles of *UGT1A1**6 and *28. *Pharmacogenet Genomics* 17: 497–504.
- Sato Y, Laird NM, Nagashima K, Kato R, Hamano T, et al. (2009) A new statistical screening approach for finding pharmacokinetics-related genes in genome-wide studies. *Pharmacogenomics J* 9: 137–146.
- Takahashi H, Kaniwa N, Saito Y, Sai K, Hamaguchi T, et al. (2013) Identification of a candidate single-nucleotide polymorphism related to

and neutropenia. “*UGT1A1**6 or *28” is a genetic factor constructed from 2 polymorphisms (*UGT1A1**6 and *28); “2” indicates *6/*6, *28/*28 or *6/*28, “1” indicates *6 or *28, and “0” indicates “other than 2 and 1.” Area: body surface area (m^2), PS: performance status, Cr: grade of creatinine, Hg: grade of hemoglobin, Alb: grade of albumin, ALP: grade of alkaline phosphatase, and GOT: grade of glutamic oxaloacetic transaminase. Each laboratory test value (Alb, Hg, GOT, ALP, and Cr) was recorded before the irinotecan therapy. For each type of clinical tests the grade and aberrant values were defined according to the National Cancer Institute - Common Toxicity Criteria (NCI-CTC, Version 2.0). $C_{max}/dose$: SN38 $C_{max}/dose$ [$10^{-3} \times m^2/L$]. AUC: area under the concentration-time curve. AUC ratio: Ratio of AUC_{SN38}/AUC_{CPT-11} . 5-FU: 5-fluorouracil, CDDP: cisplatin, MMC: mitomycin C, VP16: etoposide. * and † indicate $p < 0.05$ and $0.05 \leq p < 0.10$, respectively. For each concomitant drug, 0 means “not administered,” 1 indicates administered.

(XLS)

Table S2 GO term list for transporter activity and the related functions.

(XLS)

Table S3 Statistical information on the chemotherapeutic response (incidence of grade ≥ 2 diarrhea) of irinotecan-treated cancer patients ($p < 0.05$). RS number: reference SNP identification number in dbSNP; p values were calculated using Fisher's exact test and q values were calculated using the Benjamini-Hochberg (BH) method from p values.

(XLS)

Table S4 Statistical information on the chemotherapeutic response (incidence of grade ≥ 3 neutropenia) of irinotecan-treated cancer patients ($p < 0.05$). RS number: reference SNP identification number in dbSNP; p values were calculated using Fisher's exact test and q values were calculated using the Benjamini-Hochberg (BH) method from p values.

(XLS)

Acknowledgments

We thank Ms. Sumiko Ohnami for help with SNP genotyping.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HT Y. Saito NS JS HS T. Yoshida. Performed the experiments: HT KS NK HO YO MO. Analyzed the data: HT RI AT AD. Contributed reagents/materials/analysis tools: HT YM TH Y. Shimada AO T. Yoshino TD. Contributed to the writing of the manuscript: HT.

- chemotherapeutic response through a combination of knowledge-based algorithm and hypothesis-free genomic data. *J Biosci Bioeng* 116: 768–773.
- van Kuilenburg AB, Müller EW, Haasjes J, Meinsma R, Zoetekouw L, et al. (2001) Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clin Cancer Res* 7: 1149–1153.
- Raida M, Schwabe W, Hausler P, Van Kuilenburg AB, Van Gennip AH, et al. (2001) Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)-related toxicity compared with controls. *Clin Cancer Res* 7: 2832–2839.
- Efferth T, Volm M (2005) Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther* 107: 155–176.
- Slatter JG, Su P, Sams JP, Schaaf LJ, Wienkers LC (1997) Bioactivation of the anticancer agent CPT-11 to SN-38 by human hepatic microsomal carboxylesterases and the in vitro assessment of potential drug interactions. *Drug Metab Dispos* 25: 1157–1164.

12. Iyer L, King CD, Whittington PF, Green MD, Roy SK, et al. (1998) Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J Clin Invest* 101: 847–854.
13. Ciotti M, Basu N, Brangi M, Owens IS (1999) Glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by the human UDP-glucuronosyltransferases encoded at the *UGT1* locus. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 199–202.
14. Gagne JF, Montminy V, Belanger P, Journault K, Gaucher G, et al. (2002) Common human *UGT1A* polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). *Mol Pharmacol* 62: 608–617.
15. Haaz MC, Rivory L, Riche C, Vernillet L, Robert J (1998) Metabolism of irinotecan (CPT-11) by human hepatic microsomes: participation of cytochrome P-450 3A and drug interactions. *Cancer Res* 58: 468–472.
16. Sai K, Saito Y, Fukushima-Uesaka H, Kurose K, Kaniwa N, et al. (2008) Impact of *CYP3A4* haplotypes on irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 62: 529–537.
17. Sparreboom A, Danesi R, Ando Y, Chan J, Figg WD (2003) Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat* 6: 71–84.
18. Nozawa T, Minami H, Sugiura S, Tsuji A, Tamai I (2005) Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos* 33: 434–439.
19. Iyer L, Das S, Janisch L, Wen M, Ramirez J, et al. (2002) *UGT1A1*28* polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J* 2: 43–47.
20. Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, et al. (2004) Genetic variants in the *UDP-glucuronosyltransferase 1A1* gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 22: 1382–1388.
21. Han JY, Lim HS, Shin ES, Yoo YK, Park YH, et al. (2006) Comprehensive analysis of *UGT1A* polymorphisms predictive for pharmacokinetics and treatment outcome in patients with non-small-cell lung cancer treated with irinotecan and cisplatin. *J Clin Oncol* 24: 2237–2244.
22. Jada SR, Lim R, Wong CI, Shu X, Lee SC, et al. (2007) Role of *UGT1A1*6*, *UGT1A1*28* and *ABCG2 c.421C>A* polymorphisms in irinotecan-induced neutropenia in Asian cancer patients. *Cancer Sci* 98: 1461–1467.
23. Sai K, Saito Y, Sakamoto H, Shirao K, Kurose K, et al. (2008) Importance of *UDP-glucuronosyltransferase 1A1*6* for irinotecan toxicities in Japanese cancer patients. *Cancer Lett* 261: 165–171.
24. Sai K, Saito Y, Maekawa K, Kim SR, Kaniwa N, et al. (2010) Additive effects of drug transporter genetic polymorphisms on irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics in Japanese cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 66: 95–105.
25. Mathijssen RH, Marsh S, Karlsson MO, Xie R, Baker SD, et al. (2003) Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics. *Clin Cancer Res* 9: 3246–3253.
26. Sai K, Kaniwa N, Itoda M, Saito Y, Hasegawa R, et al. (2003) Haplotype analysis of ABCB1/MDR1 blocks in a Japanese population reveals genotype-dependent renal clearance of irinotecan. *Pharmacogenetics* 13: 741–757.
27. Zhou Q, Sparreboom A, Tan EH, Cheung YB, Lee A, et al. (2005) Pharmacogenetic profiling across the irinotecan pathway in Asian patients with cancer. *Br J Clin Pharmacol* 59: 415–424.
28. de Jong FA, Marsh S, Mathijssen RH, King C, Verweij J, et al. (2004) ABCG2 pharmacogenetics: ethnic differences in allele frequency and assessment of influence on irinotecan disposition. *Clin Cancer Res* 10: 5889–5894.
29. de Jong FA, Scott-Horton TJ, Kroetz DL, McLeod HL, Friberg LE, et al. (2007) Irinotecan-induced diarrhea: functional significance of the polymorphic ABCG2 transporter protein. *Clin Pharmacol Ther* 81: 42–49.
30. Xiang X, Jada SR, Li HH, Fan L, Tham LS, et al. (2006) Pharmacogenetics of SLCO1B1 gene and the impact of *1b and *15 haplotypes on irinotecan disposition in Asian cancer patients. *Pharmacogenet Genomics* 16: 683–691.
31. Takane H, Miyata M, Burioka N, Kurai J, Fukuoka Y, et al. (2007) Severe toxicities after irinotecan-based chemotherapy in a patient with lung cancer: a homozygote for the SLCO1B1*15 allele. *Ther Drug Monit* 29: 666–668.
32. Han JY, Lim HS, Shin ES, Yoo YK, Park YH, et al. (2008) Influence of the organic anion-transporting polypeptide 1B1 (*OATP1B1*) polymorphisms on irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 59: 69–75.
33. Han JY, Lim HS, Park YH, Lee SY, Lee JS (2009) Integrated pharmacogenetic prediction of irinotecan pharmacokinetics and toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 63: 115–120.
34. Michael M, Thompson M, Hicks RJ, Mitchell PL, Ellis A, et al. (2006) Relationship of hepatic functional imaging to irinotecan pharmacokinetics and genetic parameters of drug elimination. *J Clin Oncol* 24: 4228–4235.
35. Sai K, Itoda M, Saito Y, Kurose K, Katori N, et al. (2006) Genetic variations and haplotype structures of the *ABCB1* gene in a Japanese population: an expanded haplotype block covering the distal promoter region, and associated ethnic differences. *Ann Hum Genet* 70: 605–622.
36. Yang X, Hu Z, Chan SY, Chan E, Goh BC, et al. (2005) Novel agents that potentially inhibit irinotecan-induced diarrhea. *Curr Med Chem* 12: 1343–1358.
37. Kawato Y, Sekiguchi M, Akahane K, Tsutomi Y, Hirota Y, et al. (1993) Inhibitory activity of camptothecin derivatives against acetylcholinesterase in dogs and their binding activity to acetylcholine receptors in rats. *J Pharm Pharmacol* 45: 444–448.
38. Hyatt JL, Tsurkan L, Morton CL, Yoon KJ, Harel M, et al. (2003) Inhibition of acetylcholinesterase by the anticancer prodrug CPT-11. *Chem Biol Interact* 157–158: 247–252.
39. Takakura A, Kurita A, Asahara T, Yokoba M, Yamamoto M, et al. (2012) Rapid deconjugation of SN-38 glucuronide and adsorption of released free SN-38 by intestinal microorganisms in rat. *Oncol Lett* 3: 520–524.
40. Yamamoto M, Kurita A, Asahara T, Takakura A, Katono K, et al. (2008) Metabolism of irinotecan and its active metabolite SN-38 by intestinal microflora in rats. *Oncol Rep* 20: 727–730.
41. Kuhn JG (1998) Pharmacology of irinotecan. *Oncology (Williston Park)* 12: 39–42.
42. Takahashi H, Honda H (2006) Modified signal-to-noise: a new simple and practical gene filtering approach based on the concept of projective adaptive resonance theory (PART) filtering method. *Bioinformatics* 22: 1662–1664.
43. Takahashi H, Kobayashi T, Honda H (2005) Construction of robust prognostic predictors by using projective adaptive resonance theory as a gene filtering method. *Bioinformatics* 21: 179–186.
44. Takahashi H, Iwakawa H, Nakao S, Ojio T, Morishita R, et al. (2008) Knowledge-based fuzzy adaptive resonance theory and its application to the analysis of gene expression in plants. *J Biosci Bioeng* 106: 587–593.
45. Takahashi H, Honda H (2006) Prediction of peptide binding to major histocompatibility complex class II molecules through use of boosted fuzzy classifier with SWEEP operator method. *J Biosci Bioeng* 101: 137–141.
46. Kawamura T, Takahashi H, Honda H (2008) Proposal of new gene filtering method, BagPART, for gene expression analysis with small sample. *J Biosci Bioeng* 105: 81–84.
47. Takahashi H, Takahashi A, Naito S, Onouchi H (2012) BAUCAS: a novel BLAST-based algorithm for the identification of upstream open reading frames with conserved amino acid sequences and its application to the *Arabidopsis thaliana* genome. *Bioinformatics* 28: 2231–2241.
48. Chiba Y, Mineta K, Hirai MY, Suzuki Y, Kanaya S, et al. (2013) Changes in mRNA stability associated with cold stress in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell Physiol* 54: 180–194.
49. Iwasaki M, Takahashi H, Iwakawa H, Nakagawa A, Ishikawa T, et al. (2013) Dual regulation of *ETTIN (ARF3)* gene expression by AS1-AS2, which maintains the DNA methylation level, is involved in stabilization of leaf adaxial-abaxial partitioning in *Arabidopsis*. *Development* 140: 1958–1969.
50. Kojima S, Iwasaki M, Takahashi H, Imai T, Matsumura Y, et al. (2011) ASYMMETRIC LEAVES2 and Elongator, a histone acetyltransferase complex, mediate the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 52: 1259–1273.
51. Kotooka N, Komatsu A, Takahashi H, Nonaka M, Kawaguchi C, et al. (2013) Predictive value of high-molecular weight adiponectin in subjects with a higher risk of the development of metabolic syndrome: From a population based 5-year follow-up data. *Int J Cardiol* 167: 1068–1070.
52. Matsuo N, Mase H, Makino M, Takahashi H, Banno H (2009) Identification of ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1-upregulated genes during in vitro shoot regeneration. *Plant Biotechnol* 26: 385–393.
53. Nakagawa A, Takahashi H, Kojima S, Sato N, Ohga K, et al. (2012) Berberine enhances defects in the establishment of leaf polarity in *asymmetric leaves1* and *asymmetric leaves2* of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 79: 569–581.
54. Nakayama R, Nemoto T, Takahashi H, Ohta T, Kawai A, et al. (2007) Gene expression analysis of soft tissue sarcomas: characterization and reclassification of malignant fibrous histiocytoma. *Mod Pathol* 20: 749–759.
55. Sano M, Aoyagi K, Takahashi H, Kawamura T, Mabuchi T, et al. (2010) Forkhead box A1 transcriptional pathway in KRT7-expressing esophageal squamous cell carcinomas with extensive lymph node metastasis. *Int J Oncol* 36: 321–330.
56. Yajima I, Kumasaka MY, Naito Y, Yoshikawa T, Takahashi H, et al. (2012) Reduced GNG2 expression levels in mouse malignant melanomas and human melanoma cell lines. *Am J Cancer Res* 2: 322–329.
57. Yoshimura K, Mori T, Yokoyama K, Koike Y, Tanabe N, et al. (2011) Identification of alternative splicing events regulated by an *Arabidopsis* serine/arginine-like protein, atSR45a, in response to high-light stress using a tiling array. *Plant Cell Physiol* 52: 1786–1805.
58. Takahashi H, Iwakawa H, Ishibashi N, Kojima S, Matsumura Y, et al. (2013) Meta-analyses of microarrays of *Arabidopsis asymmetric leaves1 (asl1)*, *asl2* and their modifying mutants reveal a critical role for the ETT pathway in stabilization of adaxial-abaxial patterning and cell division during leaf development. *Plant Cell Physiol* 54: 418–431.
59. Takahashi H, Murase Y, Kobayashi T, Honda H (2007) New cancer diagnosis modeling using boosting and projective adaptive resonance theory with improved reliable index. *Biochem Eng J* 33: 100–109.
60. Takahashi H, Nemoto T, Yoshida T, Honda H, Hasegawa T (2006) Cancer diagnosis marker extraction for soft tissue sarcomas based on gene expression profiling data by using projective adaptive resonance theory (PART) filtering method. *BMC Bioinformatics* 7: 399.
61. Takahashi H, Aoyagi K, Nakanishi Y, Sasaki H, Yoshida T, et al. (2006) Classification of intramural metastases and lymph node metastases of esophageal

- cancer from gene expression based on boosting and projective adaptive resonance theory. *J Biosci Bioeng* 102: 46–52.
62. Takahashi H, Honda H (2006) Lymphoma prognostication from expression profiling using a combination method of boosting and projective adaptive resonance theory. *J Chem Eng Jpn* 39: 767–771.
 63. Takahashi H, Honda H (2005) A new reliable cancer diagnosis method using boosted fuzzy classifier with a SWEEP operator method. *J Chem Eng Jpn* 38: 763–773.
 64. Takahashi H, Masuda K, Ando T, Kobayashi T, Honda H (2004) Prognostic predictor with multiple fuzzy neural models using expression profiles from DNA microarray for metastases of breast cancer. *J Biosci Bioeng* 98: 193–199.
 65. Takahashi H, Tomida S, Kobayashi T, Honda H (2003) Inference of common genetic network using fuzzy adaptive resonance theory associated matrix method. *J Biosci Bioeng* 96: 154–160.
 66. Takahashi H, Nakayama R, Hayashi S, Nemoto T, Murase Y, et al. (2013) Macrophage migration inhibitory factor and stearoyl-CoA desaturase 1: potential prognostic markers for soft tissue sarcomas based on bioinformatics analyses. *PLoS One* 8: e78250.
 67. Fisher RA (1922) On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *J Roy Statistical Society* 85: 87–94.
 68. Pitman EJJ (1938) Significance tests which may be applied to samples from any population. Part III. The analysis of variance test. *Biometrika* 29: 322–335.
 69. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc serB* 57: 298–300.
 70. Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE T Automat Contr* 19: 716–723.
 71. Sakamoto Y, Ishiguro M, Kitagawa G (1986) Akaike Information Criterion Statistics. Dordrecht: Reidel Publishing Company.
 72. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M (2006) Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet* 38: 209–213.
 73. Delmas P, Brown DA (2005) Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat Rev Neurosci* 6: 850–862.
 74. Miceli F, Soldovieri MV, Martire M, Tagliatela M (2008) Molecular pharmacology and therapeutic potential of neuronal Kv7-modulating drugs. *Curr Opin Pharmacol* 8: 65–74.
 75. Brown DA, Passmore GM (2009) Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br J Pharmacol* 156: 1185–1195.
 76. Jepps TA, Greenwood IA, Moffatt JD, Sanders KM, Oliya S (2009) Molecular and functional characterization of Kv7 K⁺ channel in murine gastrointestinal smooth muscles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297: G107–115.
 77. Schwake M, Jentsch TJ, Friedrich T (2003) A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO Rep* 4: 76–81.
 78. Cavaliere S, Malik BR, Hodge JJ (2013) KCNQ channels regulate age-related memory impairment. *PLoS One* 8: e62445.
 79. Perez C, Vega R, Soto E (2010) Phospholipase C-mediated inhibition of the M-potassium current by muscarinic-receptor activation in the vestibular primary-afferent neurons of the rat. *Neurosci Lett* 468: 238–242.
 80. Blandizzi C, De Paolis B, Colucci R, Lazzeri G, Baschiera F, et al. (2011) Characterization of a novel mechanism accounting for the adverse cholinergic effects of the anticancer drug irinotecan. *Br J Pharmacol* 132: 73–84.
 81. Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, et al. (2008) Variants in *KCNQ1* are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 40: 1092–1097.
 82. Ichihara S, Toyooka S, Fujiwara Y, Hotta K, Shigematsu H, et al. (2007) The impact of epidermal growth factor receptor gene status on gefitinib-treated Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 120: 1239–1247.
 83. Seo S, Takayama K, Uno K, Ohi K, Hashimoto R, et al. (2013) Functional Analysis of Deep Intronic SNP rs13438494 in Intron 24 of *PCLO* Gene. *PLoS One* 8: e76960.
 84. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM (2007) Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Res* 67: 9609–9612.
 85. Capon F, Allen MH, Ameen M, Burden AD, Tillman D, et al. (2004) A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Hum Mol Genet* 13: 2361–2368.
 86. Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskiy O, et al. (2006) Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* 314: 1930–1933.
 87. Nielsen KB, Sorensen S, Cartegni L, Corydon TJ, Doktor TK, et al. (2007) Seemingly neutral polymorphic variants may confer immunity to splicing-inactivating mutations: a synonymous SNP in exon 5 of *MCAD* protects from deleterious mutations in a flanking exonic splicing enhancer. *Am J Hum Genet* 80: 416–432.
 88. Spasovski V, Tosic N, Nikecivic G, Stojiljkovic M, Zukic B, et al. (2013) The influence of novel transcriptional regulatory element in intron 14 on the expression of Janus kinase 2 gene in myeloproliferative neoplasms. *J Appl Genet* 54: 21–26.
 89. Xue G, Aida Y, Onodera T, Sakudo A (2012) The 5' flanking region and intron 1 of the bovine prion protein gene (*PRNP*) are responsible for negative feedback regulation of the prion protein. *PLoS One* 7: e32870.
 90. Yoshida T, Ono H, Kuchiba A, Sacki N, Sakamoto H (2010) Genome-wide germline analyses on cancer susceptibility and GeMDBG database: Gastric cancer as an example. *Cancer Sci* 101: 1582–1589.

薬物相互作用に影響を及ぼす遺伝子多型とその人種差

前川京子 Keiko MAEKAWA 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部第2室室長
佐井君江 Kimie SAI 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部第1室室長

1 はじめに

医薬品開発においては、副作用発現や有効性の変動要因となり得る薬物相互作用の有無について、適正に試験し評価することが求められている。近年、薬物代謝酵素のみならずトランスポーターに関する研究の進展に伴い、被験薬の薬物動態に対する、これらの分子の影響を定量的に評価するための検討方法を提示した薬物相互作用ガイドラインの改定が欧州、米国および我が国の規制当局で進められている。一方、薬物動態関連分子の中には、活性変化をもたらす遺伝子多型が存在し、患者の遺伝的要因が薬物相互作用を増強する事例も報告されている。さらに一部の遺伝子多型には、その頻度に大きな人種差・民族差が認められることから、今後加速する医薬品の国際共同開発においても、特に遺伝子多型の人種差を考慮した適正な薬物相互作用の評価が重要となる。本稿では、人種差が注目されている薬物動態関連分子の遺伝子多型を取り上げ、これらの薬物相互作用への影響について事例を含めて概説する。

2 薬物動態関連分子の遺伝子多型

ゲノム配列上には、約1,000塩基に1か所以上の塩基置換や、挿入・欠損等の遺伝子多型があり、また一定の長さの配列について、その繰り返し回数が異なるコピー数多型等も知られている。これらの多型は、遺伝子の発現量(mRNA量)やタンパク質機能(酵素であれば酵素活性)に影響を及ぼすことがあり、薬物代謝酵素やトランスポーター等の遺伝子多型は、薬物応答性の個人差や人種差の原因となり得る^{1,2)}。医薬品開発段階においても被験薬の体内動態に影響する遺伝子多型、およびその頻度の人種差を

念頭に臨床試験を行う必要がある。現在、我が国で改定が進められている“医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン”においても「遺伝子多型を考慮した薬物相互作用」に関する記述が検討されている(2014年3月時点)。以下では、薬物相互作用に関して特に考慮すべき主要な遺伝子多型を取り上げ、その人種差・民族差について解説する。

1. Cytochrome P 450 2 C 9(CYP 2 C 9)

CYP 2 C 9は、ワルファリンやフェニトイン等の治療域の狭い医薬品を含め、現在処方されている医薬品の約15~20%の代謝に関与する。活性低下を伴う多型として、*2(430 C>T, Arg 144 Cys)と*3(1075 A>C, Ile 359 Leu)が知られ、*2は東アジア人にはほとんど見いだされず、*3の頻度も白人と比較して低い(表1)。なお両多型による活性低下の程度は、基質薬により異なることにも留意したい。³⁾

2. CYP 2 C 19

CYP 2 C 19は、ヒト肝臓P 450量に占める割合が1%に過ぎないが、⁴⁾プロトンポンプ阻害剤等、多くの医薬品の代謝に関与する。活性欠損型の重要な多型に、*2(681 G>A, スプライス異常)と*3(636 G>A, Trp 212 X)があり、これらの頻度に大きな人種差が認められる(表1)。日本人では、*2および*3のホモ接合(*2/*2または*3/*3)および複合ヘテロ接合(*2/*3)の割合は約16%に達し、約6人に1人がCYP 2 C 19活性をほとんど有しない低代謝型(poor metabolizer: PM)であるのに対し、白人では大多数が通常の活性を有する高代謝型(extensive metabolizer: EM)であり、PMはわずか2%である。また*3については、東アジア圏内においても民族差があることに注意したい。

表1 機能変化を伴う主な薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子多型と人種差

遺伝子名	アレル ^{a)} または ハプロ タイプ	多型位置 ^{b)}	アミノ酸 置換等	アレル頻度 ^{c)}					機能変化
				東アジア人			白人	アフリカ人	
				日本人	韓国人	中国人			
CYP2C9	*2	430 C>T	Arg 144 Cys	ND ^{d)}	ND	0.001	0.140	0.022	活性低下
	*3	1075 A>C	Ile 359 Leu	0.029	0.036	0.037	0.064	0.018	活性低下
CYP2C19	*2	681 G>A	Splice defect	0.293	0.275	0.292	0.145	0.185	活性欠損
	*3	636 G>A	Trp 212 X	0.124	0.088	0.042	<0.001	0.004	活性欠損
	*17	-3402 C>T, -806 C>T	Increased transcription	0.011	0.012	0.010	0.188	0.235	活性上昇
CYP2D6	*3	775 delA	Arg 259 Glyfs	ND	ND	ND	0.018	0.002	活性欠損
	*4	IVS 3-1 G>A	Splice defect	0.003	0.004	0.002	0.205	0.057	活性欠損
	*5	CYP 2 D 6 deleted	—	0.058	0.060	0.060	0.025	0.033	活性欠損
	*6	454 delT	Trp 152 Glyfs	ND	ND	<0.001	0.011	0.002	活性欠損
	*10	100 C>T	Pro 34 Ser	0.379	0.455	0.526	0.018	0.042	活性低下
CYP3A5	*3	IVS 3-237 A>G	Splice defect	0.762	0.759	0.737	0.955	0.318	活性欠損
UGT1A1	*6	211 G>A	Gly 71 Arg	0.155	0.220	0.205	0.003	ND	活性低下
	*28	-54_-39 [A(TA),TAA] > [A(TA),TAA]	—	0.110	0.115	0.127	0.340	0.401	発現低下
	*5	—	—	—	—	—	—	—	—
SLCO1B1	*15 *17 ^{e)}	521 T>C	Val 174 Ala	0.139	0.136	0.127	0.161	0.048	活性低下
ABCG2	—	421 C>A	Gln 141 Lys	0.313	0.284	0.315	0.105	0.027	発現低下

a) CYP アレル命名委員会による定義 (<http://www.cypalleles.ki.se/>)

b) 開始コドン ATG の A を +1 とする。

c) Kurose K. et al., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27, 9-54 (2012).

d) ND : not detected

e) 521 T>C (Val 174 Ala) を含む 3 種のハプロタイプ *OATP1B1* *5 (-11187 G-388 A-521 C), *15 (-11187 G-388 G-521 C), *17 (-11187 A-388 G-521 C) を含む。

3. CYP2D6

CYP 2D6 は医薬品の 25% 以上を代謝し、主要な基質として、タモキシフェンおよびコデイン等がある。CYP 2D6 には、100 種以上のアレル(遺伝子多型上の対立遺伝子の 1 つ)、またはその組み合わせであるハプロタイプが知られ (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>)、発現量や活性に影響する多型も多い。白人に多い多型に、*4 (スプライス異常) があり、一方、日本人を含む東アジア人には低活性型の *10 が多く、次いで全欠損型の *5 も認められる (表 1)。これらのアレルの組み合わせにより、代謝活性がほとんど消失した PM は、東アジア人では約 1% であるが、白人では 7~10% と高頻度である。⁵⁾

4. CYP3A5

CYP 3A サブファミリーに属する CYP 3A5 は、

CYP 3A4 と類似した基質特異性を有し、医薬品の約半数を代謝する。CYP 3A5 の発現量の個人差は極めて大きく、これは主にスプライス異常を引き起こす *3 (イントロン 3 の多型 IVS 3-237 A>G) に起因する。⁶⁾ 本多型の頻度は、白人では 95% 以上、東アジア人では約 75% である (表 1)。*3 をホモ接合体 (*3/*3) で有するヒトにおいて、免疫抑制薬タクロリムスの薬物動態の変化が報告されているが、臨床問題となる影響は一般的に少ないとされている。⁵⁾

5. UDP-グルクロン酸転移酵素 1A1 (UDP-glucuronosyltransferase 1A1 : UGT1A1)

UGT の分子種の 1 つである UGT 1A1 は、抗がん剤イリノテカンの活性代謝物 SN-38 や骨粗しょう症治療薬ラロキシフェン等のグルクロン酸抱合に関与している。活性低下を引き起こす *6 (211 G>

A, Gly 71 Arg)の頻度は, 東アジア人で特徴的に高く(表1), 一方で, プロモーター領域(-54_-39)のTA反復回数の多型(通常6回が7回に増幅)で発現低下をもたらす*28は, 白人や黒人で多く, 東アジア人の約3~4倍の頻度である(表1).

6. 有機アニオントランスポーターポリペプチド1B1 (Organic anion transporting polypeptide 1B1 : OATP1B1)

OATP1B1は, 肝細胞の血管側膜に特異的に発現し, HMG-CoA還元酵素阻害剤や抗がん剤メトトレキサート等の多くの薬物の肝取り込みに関与する.⁷⁾ OATP1B1をコードする遺伝子である solute carrier organic anion transporter family member 1B1 (SLCO1B1)には, 発現量の減少と輸送活性の低下を引き起こす多型として521 T>C (Val 174 Ala)が知られており, 黒人では頻度が低いが, 東アジア人のアレル頻度は約14%であり, 白人とほぼ等しい(表1). 一方, 日本人でアレル頻度約60%で見いだされる388 A>G (Asn 130 Asp)は, 発現系や基質に依存して輸送活性への影響が異なる.⁷⁾ 両多型によるハプロタイプのうち, 521 T>C (Val 174 Ala)を含む*5 (388 A-521 C)および*15 (388 G-521 C)をホモ接合またはヘテロ接合で有する場合, OATP1B1の基質となる多くの薬物の血中濃度-時間曲線下面積(area under the blood concentration-time curve : AUC)が上昇することが知られている.⁷⁾ なお521 T>C (Val 174 Ala)多型に加え, 本遺伝子のプロモーター部位に変異(-11187 G>A)を有するハプロタイプ*17 (-11187 A-388 G-521 C)も報告されている.⁸⁾

7. 乳癌耐性蛋白 (Breast cancer resistance protein : BCRP)

BCRPは, 肝臓や小腸の管腔側膜に発現し, イリノテカンの代謝物であるSN-38およびSN-38 G等の胆汁または消化管排泄に関与している. 本トランスポーターをコードするATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2)遺伝子には50種類以上の多型が報告されているが,⁹⁾ タンパク発現量の低下を伴う421 C>A (Gln 141 Lys)は, 東アジア人で頻度が高く(表1), スルファサラジンやロスバスタチンのAUCの上昇等, 臨床上的有用性が示されている.⁹⁾

3 遺伝子多型を考慮した薬物相互作用の検討

被験者の遺伝子型により, 特定の酵素またはトランスポーターにより引き起こされる薬物相互作用の程度(阻害または誘導)が異なることがあり, 臨床薬物相互作用試験の実施にあたり遺伝子型により層別化したデザインが有用な場合がある. 一般に, ある被験薬の主要な消失経路(酵素またはトランスポーター)の活性が正常であるEM(トランスポーターに関しては高活性型)の方が, 活性が欠損または低下しているPM(同上, 低活性型)と比較して, 当該経路の阻害薬を併用した際の被験薬のAUCの上昇率(クリアランスの減少率)は顕著である(以下, EM—当該経路阻害剤による影響). しかし注意すべき点として, PMではEMと比較して単独投与における薬物の血中濃度は高く, 代替経路の代謝または排泄を阻害する薬剤と併用された場合には, 更に血中濃度は高くなり, 安全性の問題が生じる可能性がある(以下, PM—代替経路阻害剤による影響). 以下に, 主要消失経路にかかわる遺伝子多型について, EMまたはPMが顕著に影響を受ける薬物相互作用の事例を紹介する.

1. CYP2C9の遺伝子多型と薬物相互作用

フルルビプロフェンとフルコナゾール(EM—当該経路阻害剤による影響)

健康人において, 非ステロイド性抗炎症剤フルルビプロフェン(CYP2C9基質)の薬物動態に対する抗真菌薬フルコナゾール(CYP2C9阻害剤)による相互作用が検討された. CYP2C9の野生型(*1/*1)および低活性型のCYP2C9*3のヘテロ接合体(*1/*3)では, フルコナゾール投与後のフルルビプロフェンのAUCは, 投与前のそれぞれ3.2および2.4倍に上昇したが, CYP2C9*3ホモ接合体(*3/*3)ではAUCに変化は認められなかった.¹⁰⁾

2. CYP2C19の遺伝子多型と薬物相互作用

1) ランソプラゾールとフルボキサミン(EM—当該経路阻害剤による影響)

プロトンポンプ阻害剤のランソプラゾールは, 主としてCYP2C19およびCYP3A4で代謝される. CYP2C19に対して強い阻害作用を有するフ

ルボキサミンと併用した際の本剤のAUCは、CYP2C19のEMではプラセボ併用群の3.8倍に上昇したが、CYP2C19のPMではフルボキサミン併用による影響を受けないことが報告されている。¹¹⁾

2) ポリコナゾールとエリスロマイシン(PM-代替経路阻害剤による影響)

アゾール系抗真菌剤のポリコナゾールは、主にCYP2C19およびCYP2C9、さらに寄与は少ないもののCYP3A4で代謝される。マクロライド系抗生物質でCYP3A4の阻害作用を有するエリスロマイシンと本剤との相互作用に関する中国人を対象にした研究において、¹²⁾ CYP2C19のPM(*2/*2もしくは*2/*3)では、エリスロマイシンの併用により、プラセボ併用時と比較してポリコナゾールのAUCが有意に増大し、経口クリアランスが低下するものの、EM(*1/*1)ではエリスロマイシン併用による影響を受けないことが示された。これは、CYP2C19のPMではEMと比較してポリコナゾール代謝に対するCYP3A4の寄与が増大しており、CYP3A4阻害薬との併用による代替代謝経路の遮断が、ポリコナゾールの全身曝露の増大を引き起こしたためと考えられる。CYP2C19のPMの頻度は、前述のように日本を含む東アジア人で高く、ポリコナゾールの副作用である肝毒性の発生に注意が必要である。

3. CYP2D6の遺伝子多型と薬物相互作用

1) デシプラミンとパロキセチン(EM-当該経路阻害剤による影響)

選択的セロトニン再取り込み阻害剤パロキセチンはCYP2D6の基質であるとともに、CYP2D6の阻害作用を有する。CYP2D6で代謝されるデシプラミン(既に日本と欧州では発売中止)と本剤を併用した際、CYP2D6のEMではデシプラミンの総クリアランスがパロキセチン非併用時の20%に減少する。一方、CYP2D6のPMではデシプラミンの総クリアランスに対するパロキセチン併用の影響は認められないことが報告されている。¹³⁾

2) トルテロジンとケトコナゾール(PM-代替経路阻害剤による影響)

ムスカリン受容体拮抗薬であり、過活動膀胱治療薬として用いられるトルテロジンはCYP2D6に

よりフェニル基5位のメチル基が酸化され、トルテロジンと同程度の薬理活性を持つ5-ヒドロキシメチル体(5-HM)を生成する。トルテロジンおよび5-HMは、さらにCYP3A4により代謝されて不活性化(図1)。CYP2D6のPMでは、5-HMは血清中にほとんど検出されず、トルテロジンの総血清中濃度はEMと比較して高値を示す。しかし、抗ムスカリン作用はCYP2D6多型によりほとんど影響を受けないことから、本剤の薬理活性には、トルテロジンと5-HMの非結合形血清中濃度の合計(非結合形活性体濃度)が寄与すると推定されている。¹⁴⁾ 一方、CYP2D6のPMでは、代替経路にかかわるCYP3Aの阻害薬の併用でトルテロジン全身曝露が顕著に増大する。例えば、CYP2D6のPM(*3,*4,*5のホモ保有者)に、本剤とCYP3Aの強力な阻害剤である抗菌薬ケトコナゾールを併用した場合、本剤の経口クリアランスが、ケトコナゾール非併用時の40%に低下し、AUCが2倍以上増加することが報告されている。¹⁵⁾ なおケトコナゾールは、我が国では経口薬としては未承認であるが、欧州では、肝障害発症リスクが高いことから最近、販売が中止された。米国では、肝障害のほか副腎不全、さらに薬物相互作用の問題から、ケトコナゾールに厳しい使用制限を設けている。

4. OATP1B1の遺伝子多型と薬物相互作用

1) アトルバスタチンとリファンピシン(高活性型-当該経路阻害剤による影響)

SLCO1B1低活性型の多型である521T>C(Val174Ala)について、抗高脂血症薬アトルバスタチン(OATP1B1基質)の薬物動態に対する抗結核薬リファンピシン(OATP1B1阻害剤)併用による影響が検討された。リファンピシンの単回経口投与により、アトルバスタチンのAUCは521T>C(Val174Ala)の遺伝子型依存的に変化し、521TT、521TCおよび521CCの保有者では、リファンピシン非併用時と比較してそれぞれ833、468および330%になることが報告されている。¹⁶⁾

2) レバグリニドとシクロスポリン(高活性型-当該経路阻害剤による影響)

経口糖尿病薬のレバグリニドは、OATP1B1により肝に取り込まれ、CYP2C8およびCYP3A4

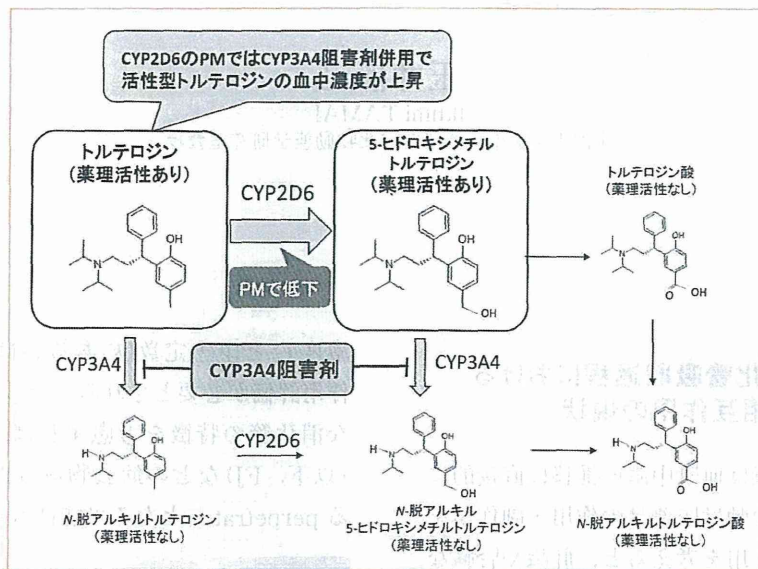


図1 トルテロジン代謝に及ぼすCYP3A4阻害剤の影響(CYP2D6のPMが相互作用を顕著に受ける例)

トルテロジンの主代謝にかかわるCYP2D6のPMでは、代替経路の阻害剤(CYP3A4阻害剤)により、活性体(非結合形トルテロジン)のAUCが顕著に増大する。

により代謝される。CYP3A4およびOATP1B1の阻害剤であるシクロスポリンとの併用により、レバグリニドのAUCは上昇するが、その上昇率は、*SLCO1B1*の521TCの保有者の方が、521TTの保有者と比較して42%低いことが報告されている。¹⁷⁾

4 おわりに

近年の薬物動態学・薬理ゲノム学研究の進展により、薬物動態に影響する遺伝子多型とその人種差、ならびに遺伝子多型の薬物相互作用への寄与に関する情報が蓄積してきた。本稿で紹介した事例から、特にCYP2D6、CYP2C9、CYP2C19、OATP1B1(*SLCO1B1*)等が主要消失経路である被験薬については、臨床薬物相互作用試験において遺伝子多型解析を実施し、多型情報を考慮した相互作用の評価を行うことが有用な場合がある。この際、一部の遺伝子多型の頻度には、東アジア人と白人との間に人種差が、さらには東アジア地域内においても民族差が存在することに留意すべきであろう。今後、アジア地域を含む多地域での国際共同治験が加速すると考えられるが、その推進においても、遺伝

子多型の人種差・民族差の情報を十分に活用しながら、薬物相互作用の適正な評価を行うことが重要となるであろう。また、これらの遺伝子多型の人種差が、実臨床下での安全性・有効性の人種差にどの程度寄与しているのかの評価を含め、更に情報の蓄積が必要と考えられる。

引用文献

- 1) Kurose K. *et al.*, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27, 9-54 (2012).
- 2) Ingelman-Sundberg M. *et al.*, *Pharmacol. Ther.*, 116, 496-526 (2007).
- 3) Kirchheiner J., Brockmoller J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 77, 1-16 (2005).
- 4) Inoue K. *et al.*, *Pharmacogenetics*, 7, 103-113 (1997).
- 5) Gardiner S. J., Begg E. J., *Pharmacol. Rev.*, 58, 521-590 (2006).
- 6) Kuehl P. *et al.*, *Nat. Genet.*, 27, 383-391 (2001).
- 7) Niemi M. *et al.*, *Pharmacol. Rev.*, 63, 157-181 (2011).
- 8) Niemi M. *et al.*, *Pharmacogenet. Genomics*, 15, 303-309 (2005).
- 9) Ieiri I., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27, 85-105 (2012).
- 10) Kumar V. *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, 36, 1242-1248 (2008).
- 11) Yasui-Furukori N. *et al.*, *J. Clin. Pharmacol.*, 44, 1223-1229 (2004).
- 12) Shi H. Y. *et al.*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 66, 1131-1136 (2010).
- 13) Brosen K. *et al.*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 44, 349-355 (1993).
- 14) Brynne N. *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 63, 529-539 (1998).
- 15) Brynne N. *et al.*, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 48, 564-572 (1999).
- 16) He Y. J. *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, 405, 49-52 (2009).
- 17) Kajosaari L. I. *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 78, 388-399 (2005).

重篤副作用に関する予測ゲノムマーカー

齋藤嘉朗,* 児玉 進, 杉山永見子, 中村亮介

Predictive Genomic Markers for Severe Adverse Drug Reactions

Yoshiro Saito,* Susumu Kodama, Emiko Sugiyama, and Ryosuke Nakamura

Division of Medicinal Safety Science, National Institute of Health Sciences;
Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.

(Received November 4, 2014)

Severe adverse drug reactions are an important issue to be considered during proper drug usage in postmarketing period. Most severe adverse reactions are idiosyncratic and unrelated to their pharmacological actions *via* primary targets. Although these reactions were not predictable, recent developments in the field of genomics have revealed closely associated markers responsible for some severe adverse reactions, including Stevens-Johnson syndrome (SJS) and toxic epidermal necrolysis (TEN). This review demonstrates genomic biomarkers for SJS/TEN and drug-induced liver injury (DILI) that were found mainly in Japanese patients and reveal ethnic differences. We and other groups have found the following associations of SJS/TEN with susceptible drugs: 1) *HLA-B*58:01* for allopurinol-related cases; 2) *HLA-B*15:01* and *HLA-A*31:01* for carbamazepine-related cases; 3) *HLA-B*51:01* for phenobarbital-related cases; 4) *HLA-A*02:07* for zonisamide-related cases; 5) *CYP2C9*3* for phenytoin-related cases; and 6) *HLA-A*02:06* for cold medicine-related cases. The allele frequencies of these related *HLA* types vary among Asian populations. In addition, direct (non-covalent) binding of carbamazepine or an allopurinol metabolite, oxypurinol, to the associated *HLA*-type proteins was suggested. Associated genomic biomarkers are also summarized for DILI in Japanese and Caucasian populations. The application of these genomic biomarkers to prevent the onset of a reaction has been utilized in a few countries. However, in Japan, the package inserts only contain precautions that cite the research findings. To overcome this limitation, the following points should be addressed: 1) factors responsible for the development of SJS/TEN should be identified in addition to the above-mentioned *HLA* alleles; and 2) an inexpensive genotyping strategy and assay methods should be developed to provide a pharmaco-economic viewpoint. Further research on severe adverse reactions is warranted.

Key words—drug-induced liver injury; ethnic difference; genomic biomarker; Stevens-Johnson syndrome; toxic epidermal necrolysis

1. はじめに

重篤副作用は、副作用による死亡、生命を脅かすもの、治療のための入院又は入院期間の延長が必要であるもの、永続的又は顕著な障害・機能不全に陥るもの、先天異常等を引き起こすもの、などを指す。抗がん剤による顆粒球減少症、血小板減少症、重度の下痢など、薬理作用に基づくものもあるが、多くは特異体質性とされる薬理作用に基づかないものである。したがって、その発症予測は困難であったが、近年、発症に関連するバイオマーカーが報告

されるようになり、発症が回避できるケースも出てきた。本総説では、重篤副作用発症に関連するマーカー研究とその応用に関する現状を、最も研究が進んでいる重症薬疹を中心に紹介する。

2. 重症薬疹の発症報告数と被疑薬

わが国において、2004年と2005年に報告された重篤副作用の報告数で、第一位は薬物性肝障害、第二位は間質性肺障害であり、重症薬疹であるスティーブンス・ジョンソン症候群 (Stevens-Johnson syndrome; SJS)、中毒性表皮壊死融解症 (toxic epidermal necrolysis; TEN)、薬剤性過敏症症候群 (drug rash with eosinophilia and systemic symptoms; DRESS, hypersensitivity syndrome; HSS, drug-induced hypersensitivity syndrome; DIHS とも言う) は、いずれも10位以下に過ぎず、合計しても5位

国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

*e-mail: yoshiro@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第134年会シンポジウム S39 で発表した内容を中心に記述したものである。

Table 1. Associated HLA Types in Japanese SJS/TEN Patients by Our Studies

Drug	Genotype	Allele frequency		Odds ratio	p-value	Ref.
		Case	Population control			
Allopurinol	<i>HLA-B*58:01</i>	27.8%	0.6%	62.8	5.4×10^{-12}	1
Carbamazepine	<i>HLA-B*15:11</i>	11.9%	1%	12.2	0.0001	4
	<i>HLA-A*31:01</i>	21.4%	7%	3.2	0.0029	unpublished
Phenobarbital	<i>HLA-B*51:01</i>	43.8%	7.9%	16.7	0.0003	2
Zonisamide	<i>HLA-A*02:07</i>	20.8%	3.5%	9.77	0.0008	2
Phenytoin	<i>CYP2C9*3</i>	22.2%	2.7%	10.4	<0.0001	3
Cold medicine	<i>HLA-A*02:06</i>	45% (carrier)	13.6% (carrier)	5.18	0.0014	5

に位置する。しかし、これら重症薬疹は、医薬品副作用被害救済制度による救済件数では、常に最上位にランクされることが多い重篤副作用である。このうち、SJSとTENは、水疱、びらん等の表皮壊死、発熱等を主症状とし、SJSでは皮膚粘膜移行部の重篤な粘膜病変、TENではブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群を除外できることが診断基準となっている。表皮の剥離、びらん、水疱面積による分類で、体表面積の10%未満の場合をSJS、10%以上の場合をTENと分類されている。発症率は人口100万人あたり年間1-5人程度と非常に低いものの、SJSで1-5%、TENで20-30%と高い致死率を示す。入院による集中治療が必要で、視覚障害等の後遺症もあり問題となっている。医薬品としては、長らく高尿酸血症薬アロプリノールと抗てんかん薬カルバマゼピンが上位を占めてきたが、近年では抗てんかん薬ラモトリギンの報告が多い。また解熱鎮痛薬による報告数も比較的多い。

3. 重症薬疹のバイオマーカー研究

国立医薬品食品衛生研究所では、厚生労働省医薬食品局安全対策課、医薬品医療機器総合機構安全第二部、日本製薬団体連合会の協力の下、各製薬企業及び担当医・患者の協力を得て、発症患者のゲノムDNA及び詳細な副作用情報等を収集している。重症薬疹に関しては、確定診断後の数として、平成26年3月末までに発症例213例、可能性例35例を収集した。これらを対象に、被疑薬別にゲノムバイオマーカー探索を行っている。全ゲノムに渡る網羅的な遺伝子多型解析も行っているが、これまでに見出されたマーカーとしては、ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA) 型が多い (Table

1)。特に、HLAクラスIタンパク質は、皮膚を含む全身の細胞に発現しており、表皮細胞壊死との関連が注目されている。

3-1. アロプリノール誘因性 SJS/TEN 高尿酸血症薬アロプリノールは、安価であるためよく用いられるが、重症薬疹を引き起こす場合がある。筆者らは日本人18人のアロプリノール誘因性SJS/TEN患者を対象にゲノム解析を行ったところ、10人から*HLA-B*58:01*を見出した (保有率: 56%, アレル頻度に基づくオッズ比: 62.8, 同 $P_c = 2.84 \times 10^{-11}$) (Table 1)。¹⁾ この関連は、漢民族 (オッズ比: 580, HSS含む)、タイ人 (同 348) で強く、白人 (同 80)、韓国人 (同 34) では日本人と同程度で認められている。⁶⁾ また健常人におけるHLA型のアレル頻度には、大きな民族差があり、日本人 (0.004) と韓国人 (0.061) で10倍以上の差が認められている (Fig. 1)。⁷⁾

3-2. カルバマゼピン誘因性 SJS/TEN 抗てんかん薬カルバマゼピンは、部分発作の治療によく用いられるが、重症薬疹も認められる。筆者らは、日本人21人のカルバマゼピン誘因性SJS/TEN患者の解析を行ったところ、*HLA-B*15:11*を5名が (保有率: 24%, アレル頻度に基づくオッズ比: 12.2)、*HLA-A*31:01*を9名が (保有率 43%, 同オッズ比: 3.2) 有しており、同時に保有している例は認められなかった (一部、未発表データ) (Table 1)。⁴⁾ すなわち、この2種類のHLA型で67%の発症が説明できることとなった。*HLA-A*31:01*との関連は、筆者らの報告より前に、SJS/TEN及び他の重症薬疹に関し、日本人を対象にした報告が2報あり、また白人でも関連が示唆されてい

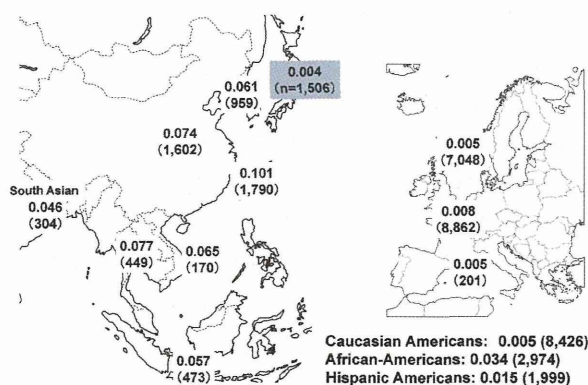


Fig. 1. Population Frequencies of *HLA-B*58:01*
Number of analyzed subjects is shown in parenthesis.

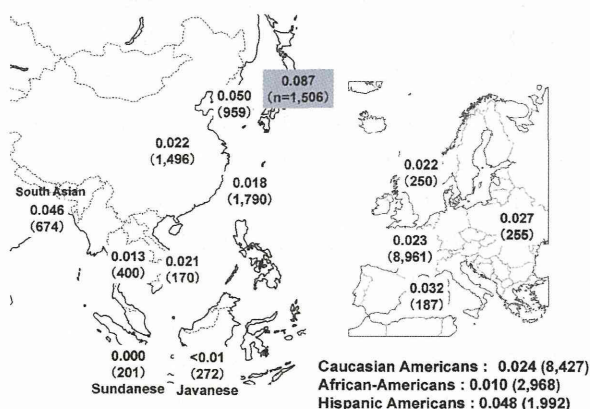


Fig. 2. Population Frequencies of *HLA-A*31:01*
Number of analyzed subjects is shown in parenthesis.

る。^{6,8-10} *HLA-A*31:01* は日本人健常人のアレル頻度が 0.087 であり、他のアジア人、白人、黒人よりも高い (Fig. 2)。一方、*HLA-B*15:11* に関しては、韓国人で同様の関連が報告されているのみである。¹¹ 漢民族、タイ人、インド人、マレー人では *HLA-B*15:02* との強い関連が報告されており、⁶ 特に台湾の漢民族では保有率が 59/60、オッズ比が 1357 との報告がある。¹² *HLA-B*15:02* と *HLA-B*15:11* は同じ血清型 *HLA-B75* に属しているが、健常人における頻度において、漢民族では *HLA-B*15:02* のアレル頻度 (0.037) が他の *HLA-B75* に属する型 (*HLA-B*15:11* で 0.011 など) と比較して高い。一方、日本人では *HLA-B*15:11* のアレル頻度 (0.007) が *HLA-B*15:02* 等のほかの型 (≤ 0.001) に比べて高い (未発表データ) ことが、相関の認められた *HLA* 型が漢民族と日本人で異なる理由と考えられる。*HLA-B75* のアレル頻度は、漢民族や東

南アジア人で 0.1 以上と高く、日本人では 0.008、白人や黒人では ≤ 0.001 と低い (未発表データ)。

3-3. 他の抗てんかん薬誘因性 SJS/TEN 症例数が少ない解析ではあるが、フェノバルビタール誘因性 SJS/TEN で *HLA-B*51:01* との有意な関連 (保有率: 6/8, アレル頻度に基づくオッズ比: 16.7, $P_c=0.004$) が、ゾニサミド誘因性 SJS/TEN で *HLA-A*02:07* との有意な関連 (保有率 5/12, アレル頻度に基づくオッズ比: 9.77, 同 $P_c=0.018$) が、それぞれ示された (Table 1).²⁾ またこれら 2 種のように、統計学的な多重性補正後に有意 ($P_c < 0.05$) ではないものの、フェニトイン誘因性 SJS/TEN でも、*HLA-B*51:01* との弱い関連 (保有率: 5/9, アレル頻度に基づくオッズ比: 6.96, 同 $P_c=0.104$) が示唆されている。²⁾ なお、フェニトインに関しては、台湾、日本、マレーシアの国際共同チームが、まず台湾人における重症薬疹 (SJS/TEN, DRESS) 発症とフェニトインの代謝酵素 *CYP2C9* の機能低下多型である *CYP2C9*3* (1075A>C, I359L) との有意な関連 (60 人の台湾人患者を対象にした解析で、 $p=1.5 \times 10^{-12}$, 30 人の検証用患者でも $p=1.0 \times 10^{-6}$) を示し、さらに本結果を日本人 SJS/TEN 患者 (Table 1) 及びマレーシア人 SJS/TEN/DRESS 患者でも検証した。実際に重症薬疹患者で、血中フェニトイン濃度が対照のフェニトイン耐性患者に比して、有意に高いことも示されている。³⁾ 一方で、最も症例数が多いラモトリギンに関しては、白人で複数の *HLA* 型と非常に弱い関連が報告されているものの、¹³⁾ 日本人を対象にした結果は、まだ得られていない。

3-4. 感冒薬誘因性 SJS/TEN 本研究は、京都府立医大の木下教授、同志社大上田准教授が中心となり、筆者らも協力した研究である。感冒薬により眼障害を伴う SJS/TEN を発症したと診断された患者を解析したところ、*HLA-A*02:06* の保有率が有意に高い (保有率に基づくオッズ比: 5.71, 同 $P_c=4.75 \times 10^{-15}$) ことが見いだされた。⁵⁾ さらに別群の眼障害を伴う SJS/TEN 試料を用いた解析でも、同 *HLA* 型との有意な関連 (保有率に基づくオッズ比: 5.18, 同 $P_c=0.0056$) が見いだされ、本結果は検証された (Table 1)。被疑薬をアセトアミノフェンに限定した場合でも有意な関連が見いだされた。

4. 重症薬疹発症の分子論的機構

以上のように、SJS/TEN 発症と HLA 型との関連が明らかとなってきているが、その分子論的根拠については、最近、複数の報告がある。まず漢民族で認められたカルバマゼピンと *HLA-B*15:02* との関連について、*HLA-B*15:02* タンパク質とカルバマゼピンとの直接の結合が、*in vitro* で示された。¹⁴⁾ さらに *HLA-B*15:02* タンパク質を発現させたヒト培養皮膚角化細胞に、カルバマゼピンを添加し、さらにカルバマゼピンによる重症薬疹発症患者由来の T 細胞を加えたところ、当該角化細胞の溶解が認められた。このような溶解は、HLA として *HLA-B*15:11* などのほかの *HLA-B75* タンパク質を発現させた場合でも認められ、遺伝子解析における *HLA-B75* とカルバマゼピンによる SJS/TEN 発症との関連が、分子論的にも示唆された。一方で、*HLA-B62* に属する *HLA-B*15:01* や *HLA-B72* に属する *HLA-B*15:03* を発現させた場合には、このような溶解はみられなかった。

また、アロプリノールはキササンチンオキシダーゼにより、オキシプリノールへと代謝されるが、最近、*HLA-B*58:01* を有する T 細胞株又はクローンは、オキシプリノールにより活性化するものが 3/4 以上であること、さらにオキシプリノールと *HLA-B*58:01* タンパク質との直接の結合もモデリングされている。¹⁵⁾ また、T 細胞株の *in vitro* での誘導は、薬物濃度にも依存することが示されている。¹⁶⁾

以上のように、抗原性を有しない低分子化合物が T 細胞を活性化させる機構として、低分子化合物の代謝活性化とタンパク質との共有結合、さらには薬物修飾抗原ペプチドの生成と HLA 分子による提示が長らく考えられおり、サルファ剤等では本ハプテン仮説は示唆されている。一方、上記のカルバマゼピンやオキシプリノールのケースは、これに該当せず、HLA タンパク質と非共有結合的に相互作用し、この HLA タンパク質と薬物の (非共有結合的) 複合体が非自己として T 細胞受容体に認識されていると考えられる。このようなスキームは、*pharmacological interaction with immune receptors (p-i)* 仮説と言われてきたが、¹⁷⁾ 上記のように示唆されるケースが徐々に増えてきている。3-3. のように、フェニトイン誘因性の重症薬疹に関しては、*CYP2C9*3* との強い関連が示されたが、同研究で

明らかとなった発症患者でのフェニトイン血中濃度の高値は、フェニトインとなんらかのタンパク質との相互作用に必要であるのかもしれない。

SJS/TEN 以外でも、抗 HIV 薬アバカビル投与で好発する HSS の場合、白人と黒人において、*HLA-B*57:01* との有意な関連が示唆されており、このケースでは、*HLA-B*57:01* 分子に結合する抗原ペプチドの種類が、薬物の HLA 分子への結合により変化し、非自己として T 細胞に認識されると考えられている。¹⁸⁾

5. HLA 型の投与前検査による重症薬疹発症の予防研究

上記のように、HLA 型と重症薬疹発症との関連が多く報告されているが、実際にその事前診断による重症薬疹発症回避の可否に関する報告は少ない。

アバカビルによる HSS 発症に関しては、*HLA-B*57:01* の投与前診断を行わない場合には 7.8% の患者が HSS を発症したが、投与前診断を行い、*HLA-B*57:01* 陽性の患者には類薬を投与した場合の発症率は 3.4% であった。¹⁹⁾ また、アバカビルによるパッチテストを行い、アバカビルによる発症を確認した患者を対象にした場合は、投与前診断を行わなかった場合の発症率は 2.7% であったが、診断を行った場合は 0% であり、投与前診断により発症を回避できることが示された。

また台湾では、カルバマゼピンを対象に *HLA-B*15:02* の投与前診断に関する研究が行われた。²⁰⁾ 対照には、*HLA-B*15:02* に関する注意喚起が添付文書に記載される以前の 2002 年から 2004 年の間の SJS/TEN の発生頻度 (0.22–0.24%) が用いられた。投与前診断の結果、陰性であった患者には予定通りカルバマゼピンが、陽性であった患者には他の抗てんかん薬が投与された。数ヶ月間追跡できたカルバマゼピン投与 4120 人の中、SJS/TEN を発症した患者は認められず、過去の発症率と有意な違いが認められた。したがって、台湾ではカルバマゼピン投与前の *HLA-B*15:02* 診断の、SJS/TEN 発症回避に関する有用性が示された。

6. HLA マーカーの行政的利用

特異体質性の副作用であり死亡率も比較的高い重症薬疹の発症回避が可能となる HLA マーカーの利用は、有用と考えられるが、その事前診断により実際にどの程度の発症が回避されるか、慎重に検討す

Table 2. Reported Genotypes Associated with Drug-induced Liver Injury (DILI)

Drug	Genotype	Ethnicity	Case (Carrier/Total)	Control (Carrier/Total)	Odds ratio	Ref.
Flucloxacillin	<i>HLA-B*57:01</i>	Caucasians	43/51	4/64	80.6	21
Lumiracoxib	<i>HLA-DQB1*06:02</i>	Mainly Caucasians	85/137	111/577	6.9	22
Ticlopidine	<i>HLA-A*33:03</i>	Japanese	15/22	12/85	13	23
Amoxicillin/Clavulanic acid	<i>HLA-DRB1*15:01- HLA-DRB5*01:01- HLA-DQB1*06:02</i>	Belgians	20/35	7/60	10.1	24
Lapatinib	<i>HLA-DQA1*02:01</i>	Mainly Caucasians	14/35 17/24	58/285 33/155	2.6 9.0	25
Ximelagatran	<i>HLA-DRB1*07</i>	Caucasians	35/74	22/130	4.4	26
Troglitazone	<i>GST M1 & T1 Double null</i>	Japanese	10/25	13/85	3.7	27

る必要がある。上記、アバカビルとカルバマゼピンの事前診断例は、前向きに発症回避を示したものであり、エビデンスレベルは高い。台湾では、カルバマゼピン投与前の *HLA-B*15:02* 診断が必須とされ、さらに保険適用もなされている。またシンガポールにおいても事前診断が必須とされているほか、米国及びカナダにおいても頻度が高い民族の患者には、それぞれ事前検査が必要及び推奨とされている。アバカビルの場合でも、欧州では *HLA-B*57:01* の投与前診断が義務づけられており、米国でも推奨されている。日本の添付文書では、いずれの HLA 型マーカーについても、本総説で紹介した論文情報の提供のみが行われている。これは結果の再現性確認を求めているものと考えられ、さらに前向き研究による発症回避の証明が期待されていると考えられる。*HLA-A*31:01* は、SJS/TEN などの重症薬疹に限らず、カルバマゼピンによる比較的軽症の薬疹発症とも関連するが、現在、理化学研究所のチームが新規投薬患者 1000 名を対象に、事前診断の有用性に関する前向き研究を行っており、その結果が待たれる。

7. 薬物性肝障害発症と関連する HLA 型

重症薬疹に加え、薬物性肝障害発症に関しても、主として HLA 型との有意な関連が報告されている (Table 2).⁶⁾

日本人を対象とした薬物性肝障害マーカー研究の対象薬としては、抗血小板薬チクロピジンと (肝障害により販売が中止された) 糖尿病薬トログリタゾンがある。前者では、*HLA-A*33:03* との有意な関

連が示され、特に胆汁うっ滞型の肝障害症例との関連が強いことが示されている。²³⁾ さらに、チクロピジンを代謝活性化する *CYP2B6* の高発現型ハプロタイプが、この関連性を高めることも報告されている。²⁸⁾ また後者では、反応性代謝物の解毒に関与するグルタチオン *S*-転移酵素 μ 型 (*GSTM1*) と θ 型 (*GSTT1*) の全欠損型との有意な関連が報告されている。²⁷⁾

白人を対象にした研究では、日本未発売の抗生物質フルククロキサシリン誘因性の肝障害における *HLA-B*57:01* との関連、同じく抗生物質アモキシシリン・クラブラン酸における *HLA-DRB1*15:01* との関連、抗がん剤ラパチニブにおける *HLA-DQA*02:01* との関連、未承認の非ステロイド性抗炎症薬ミラコキシブにおける *HLA-DQB1*06:02* との関連、などが知られている。⁶⁾ 特徴としては、重症薬疹では HLA のクラス I 分子との関連のみが報告されているが、薬物性肝障害では HLA のクラス II 分子との関連も認められており注目される。一方、医薬品と HLA クラス II 分子との直接の相互作用を示唆した報告はない。

8. おわりに

最も研究が進んでいる重症薬疹を中心に、重篤副作用マーカー研究の現状について概説した。薬理作用に基づかないことから、発症機序が不明であった重篤副作用は、一部の医薬品では薬理標的とは無関係の HLA 型に関連することが明らかになっている。この関連は統計学的に有意ではあるものの、保有者が当該医薬品を投与された場合、全員が発症す

るわけではなく、ごく一部の保有者に発症が認められるのみである。したがって、HLA型は、発症への必要条件ではあるものの、十分条件ではないと考えられる。この十分条件の解明研究が今後、必要であり、薬剤疫学による患者背景因子の解析等の別の観点からの研究が必要である。またHLA型のタイプ解析は、比較的高価であり、特定のHLA型と絶対的な連鎖不平衡を示す一塩基多型の同定、さらには安価な遺伝子多型診断法の開発が、投与前診断の医療経済学的な許容のために重要となる。重篤副作用の発症予測と機序の解明に関する研究は、緒に就いたばかりであり、今後の研究の進展が大いに必要である。

謝辞 本総説で紹介した筆者らの研究内容は、研究グループで行ったものであり、共同研究者の先生方、協力頂いた担当医と患者、さらには厚生労働省医薬食品局安全対策課、医薬品医療機器総合機構安全第二部、日本製薬団体連合会、各製薬企業の皆様に深く感謝申し上げます。また、上記研究を遂行するにあたっては、厚生労働科学研究費補助金・委託費、日本学術振興会科学研究費補助金を用いた。こちらに関しても感謝したい。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- Tohkin M., Kaniwa N., Saito Y., Sugiyama E., Kurose K., Nishikawa J., Hasegawa R., Aihara M., Matsunaga K., Abe M., Furuya H., Takahashi Y., Ikeda H., Muramatsu M., Ueta M., Sotozono C., Kinoshita S., Ikezawa Z., Japan Pharmacogenomics Data Science Consortium, *Pharmacogenomics J.*, **13**, 60–69 (2013).
- Kaniwa N., Sugiyama E., Saito Y., Kurose K., Maekawa K., Hasegawa R., Furuya H., Ikeda H., Takahashi Y., Muramatsu M., Tohkin M., Ozeki T., Mushiroda T., Kubo M., Kamatani N., Abe M., Yagami A., Ueta M., Sotozono C., Kinoshita S., Ikezawa Z., Matsunaga K., Aihara M., Japan Pharmacogenomics Data Science Consortium, *Pharmacogenomics*, **14**, 1821–1831 (2013).
- Chung W. H., Chang W. C., Lee Y. S., Wu Y., Yang C. H., Ho H. C., Chen M. J., Lin J. Y., Hui R. C., Ho J. C., Wu W. M., Chen T. J., Wu T., Wu Y. R., Hsieh M. S., Tu P. H., Chang C. N., Hsu C. N., Wu T. L., Choon S. E., Hsu C. K., Chen D. Y., Liu C. S., Lin C. Y., Kaniwa N., Saito Y., Takahashi Y., Nakamura R., Azukizawa H., Shi Y., Wang T. H., Chuang S. S., Tsai S. F., Chang C. J., Chang Y. S., Hung S. I., Taiwan Severe Cutaneous Adverse Reaction Consortium, Japan Pharmacogenomics Data Science Consortium, *JAMA*, **312**, 525–534 (2014).
- Kaniwa N., Saito Y., *Ther. Adv. Drug Saf.*, **4**, 246–253 (2013).
- Ueta M., Kaniwa N., Sotozono C., Tokunaga K., Saito Y., Sawai H., Miyadera H., Sugiyama E., Maekawa K., Nakamura R., Nagato M., Aihara M., Matsunaga K., Takahashi Y., Furuya H., Muramatsu M., Ikezawa Z., Kinoshita S., *Sci. Rep.*, **4**, 4862 (2014).
- Kaniwa N., Saito Y., *J. Hum. Genet.*, **58**, 317–326 (2013).
- Kurose K., Sugiyama E., Saito Y., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **27**, 9–54 (2012).
- Kashiwagi M., Aihara M., Takahashi Y., Yamazaki E., Yamane Y., Song Y., Muramatsu M., Ikezawa Z., *J. Dermatol.*, **35**, 683–685 (2008).
- Ozeki T., Mushiroda T., Yowang A., Takahashi A., Kubo M., Shirakara Y., Ikezawa Z., Iijima M., Shiohara T., Hashimoto K., Kamatani N., Nakamura Y., *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 1034–1041 (2011).
- McCormack M., Alfirevic A., Bourgeois S., Farrell J. J., Kasperavičiūtė D., Carrington M., Sills G. J., Marson T., Jia X., de Bakker P. I., Chinthapalli K., Molokhia M., Johnson M. R., O'Connor G. D., Chaila E., Alhusaini S., Shianna K. V., Radtke R. A., Heinzen E. L., Walley N., Pandolfo M., Pichler W., Park B. K., Depondt C., Sisodiya S. M., Goldstein D. B., Deloukas P., Delanty N., Cavalleri G. L., Pirmohamed M., *N. Engl. J. Med.*, **364**, 1134–1143 (2011).
- Kim S. H., Lee K. W., Song W. J., Kim S. H., Jee Y. K., Lee S. M., Kang H. R., Park H. W., Cho S. H., Park S. H., Min K. U., Chang Y. S., Adverse Drug Reaction Research Group in Korea, *Epilepsy Res.*, **97**, 190–197 (2011).

- 12) Hung S. I., Chung W. H., Jee S. H., Chen W. C., Chang Y. T., Lee W. R., Hu S. L., Wu M. T., Chen G. S., Wong T. W., Hsiao P. F., Chen W. H., Shin H. Y., Fang W. H., Wei C. Y., Lou Y. H., Huang Y. L., Lin J. J., Chen Y. T., *Pharmacogenet. Genomics*, **16**, 297–306 (2006).
- 13) Kazeem G. R., Cox C., Aponte J., Messenheimer J., Brazell C., Nelsen A. C., Nelson M. R., Foot E., *Pharmacogenet. Genomics*, **19**, 661–665 (2009).
- 14) Wei C. Y., Chung W. H., Huang H. W., Chen Y. T., Hung S. I., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **129**, 1562–1569.e5 (2012).
- 15) Yun J., Marcaida M. J., Eriksson K. K., Jamin H., Fontana S., Pichler W. J., Yerly D., *J. Immunol.*, **192**, 2984–2993 (2014).
- 16) Yun J., Mattsson J., Schnyder K., Fontana S., Largiadèr C. R., Pichler W. J., Yerly D., *Clin. Exp. Allergy*, **43**, 1246–1255 (2013).
- 17) Pichler W. J., Beeler A., Keller M., Lerch M., Posadas S., Schmid D., Spanou Z., Zawodniak A., Gerber B., *Allergol. Int.*, **55**, 17–25 (2006).
- 18) Ostrov D. A., Grant B. J., Pompeu Y. A., Sidney J., Harndahl M., Southwood S., Oseroff C., Lu S., Jakoncic J., de Oliveira C. A., Yang L., Mei H., Shi L., Shabanowitz J., English A. M., Wriston A., Lucas A., Phillips E., Mallal S., Grey H. M., Sette A., Hunt D. F., Buus S., Peters B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9959–9964 (2012).
- 19) Mallal S., Phillips E., Carosi G., Molina J. M., Workman C., Tomazic J., Jägel-Guedes E., Rugina S., Kozyrev O., Cid J. F., Hay P., Nolan D., Hughes S., Hughes A., Ryan S., Fitch N., Thorborn D., Benbow A., PREDICT-1 Study Team, *N. Engl. J. Med.*, **358**, 568–579 (2008).
- 20) Chen P., Lin J. J., Lu C. S., Ong C. T., Hsieh P. F., Yang C. C., Tai C. T., Wu S. L., Lu C. H., Hsu Y. C., Yu H. Y., Ro L. S., Lu C. T., Chu C. C., Tsai J. J., Su Y. H., Lan S. H., Sung S. F., Lin S. Y., Chuang H. P., Huang L. C., Chen Y. J., Tsai P. J., Liao H. T., Lin Y. H., Chen C. H., Chung W. H., Hung S. I., Wu J. Y., Chang C. F., Chen L., Chen Y. T., Shen C. Y., Taiwan SJS Consortium, *N. Engl. J. Med.*, **364**, 1126–1133 (2011).
- 21) Daly A. K., Donaldson P. T., Bhatnagar P., Shen Y., Pe'er I., Floratos A., Daly M. J., Goldstein D. B., John S., Nelson M. R., Graham J., Park B. K., Dillon J. F., Bernal W., Cordell H. J., Pirmohamed M., Aithal G. P., Day C. P., DILIGEN Study, International SAE Consortium, *Nat. Genet.*, **41**, 816–819 (2009).
- 22) Singer J. B., Lewitzky S., Leroy E., Yang F., Zhao X., Klickstein L., Wright T. M., Meyer J., Paulding C. A., *Nat. Genet.*, **42**, 711–714 (2010).
- 23) Hirata K., Takagi H., Yamamoto M., Matsumoto T., Nishiya T., Mori K., Shimizu S., Masumoto H., Okutani Y., *Pharmacogenomics J.*, **8**, 29–33 (2008).
- 24) Hautekeete M. L., Horsmans Y., Van Waeyenberge C., Demanet C., Henrion J., Verbist L., Brenard R., Sempoux C., Michielssen P. P., Yap P. S., Rahier J., Geubel A. P., *Gastroenterology*, **117**, 1181–1186 (1999).
- 25) Spraggs C. F., Budde L. R., Briley L. P., Bing N., Cox C. J., King K. S., Whittaker J. C., Mooser V. E., Preston A. J., Stein S. H., Cardon L. R., *J. Clin. Oncol.*, **29**, 667–673 (2011).
- 26) Kindmark A., Jawaid A., Harbron C. G., Barratt B. J., Bengtsson O. F., Andersson T. B., Carlsson S., Cederbrant K. E., Gibson N. J., Armstrong M., Lagerström-Fermér M. E., Dellsén A., Brown E. M., Thornton M., Dukes C., Jenkins S. C., Firth M. A., Harrod G. O., Pinel T. H., Billing-Clason S. M., Cardon L. R., March R. E., *Pharmacogenomics J.*, **8**, 186–195 (2008).
- 27) Watanabe I., Tomita A., Shimizu M., Sugawara M., Yasumo H., Koishi R., Takahashi T., Miyoshi K., Nakamura K., Izumi T., Matsushita Y., Furukawa H., Haruyama H., Koga T., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **73**, 435–455 (2003).
- 28) Ariyoshi N., Iga Y., Hirata K., Sato Y., Miura G., Ishii I., Nagamori S., Kitada M., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **25**, 298–306 (2010).

医薬品開発・適正使用におけるバイオマーカー利用とレギュラトリーサイエンス

齋藤嘉朗,^{*,a} 頭金正博^b

Regulatory Science on Biomarker Usage for Development and Proper Use of Drugs

Yoshiro Saito^{*,a} and Masahiro Tohkin^b

^aNational Institute of Health Sciences, Division of Medicinal Safety Science; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; and ^bDepartment of Regulatory Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University; 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan.

医療・健康産業の活性化や健康寿命の延伸のため、疾患や医薬品の有効性・副作用等に関する客観的生物指標（バイオマーカー）を用いた医薬品開発の効率化・迅速化、及び薬剤反応性の個人差に応じた有効で安全な個別化医療の早期実用化が求められている。さらにアルツハイマー病など、不可逆的な進行性疾患に関しては、バイオマーカーを利用した個別化予防（先制医療）が期待されている。しかし、総合科学技術会議においては、個別化医療の世界的競争におけるわが国の出遅れと創薬力の低下が指摘されている。バイオマーカー研究は、アカデミアでも多くの基礎研究が行われているものの、医薬品と同様に、これを臨床につなげ、実用化に至る道筋が確立しておらず、問題となっている。一方で、欧米では産学官がコンソーシアムを構築し、精力的に既報バイオマーカーの非臨床・臨床における有用性と適格性の評価を行っている。さらに新規マーカー探索の計画もある。今後とも、医療・健康産業における欧米との競争力を維持し、健康寿命を延伸するためには、わが国でも関係者が知恵を絞り、現状を打開する必要がある。このような意図で本シンポジウムを企画した。なお、本シンポジウムは、日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会としての提案でもある。

本シンポジウムでは、オーガナイザーによるバイ

オマーカーに関する概説の後、非臨床、臨床、市販後におけるバイオマーカー研究・開発に携わっている産学官の研究者に、最新の研究成果、利用実態、わが国における課題とその解決策、将来展望などをご紹介頂いた。さらにバイオマーカーを担当する医薬品医療機器総合機構（Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; PMDA）の審査官より、医薬品評価におけるバイオマーカー利用に向けた規制当局の取り組みが紹介された。この誌上シンポジウムでは、全シンポジストから総説をご執筆頂いた。

まず、頭金正博博士（名古屋市立大学大学院薬学研究所）らの稿「バイオマーカーの適格性評価を支えるレギュラトリーサイエンス（オーバービュー）」では、バイオマーカーの定義、種類、医薬品開発の各段階における利用の利点、臨床試験デザイン、さらには有用性・適格性を評価する場合の重要要因について、レギュラトリーサイエンスの視点から概説された後、実用化に至ったバイオマーカーの例として、ゲフィチニブ等の有効性のバイオマーカーである上皮増殖因子受容体の遺伝子変異など、3種の例を挙げて頂いた。

非臨床の視点に関しては、小林章男博士ら（日本たばこ産業）に「臨床薬剤性肝障害リスク因子特定のためのバイオマーカーの探索：endogenous metabolite 解析によるアセトアミノフェン誘発性肝障害に対する感受性予測」をご執筆頂いた。肝障害はいまだに開発中止原因の上位を占めており、非臨床段階からの発症予測診断が重要である。本稿では、臨床用量（治療用量）においても一部の患者集団（高感受性者）において肝障害が発現することが知られているアセトアミノフェン（acetaminophen;

^a国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部（〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1）、^b名古屋市立大学大学院薬学研究所レギュラトリーサイエンス分野（〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1）

*e-mail: yoshiro@nihs.go.jp

日本薬学会第134年会シンポジウム S51 序文

APAP) をモデル医薬品として取り上げ、APAP による肝障害のリスク因子に着目した非臨床評価法及び期待されるバイオマーカーについて、筆者らの研究内容と将来展望を記載頂いた。

臨床の視点については、飯田真介博士(名古屋市立大学大学院医学研究科)らに「モガムリズマブの開発からバイオマーカーを用いた至適治療法の確立を目指して：アカデミアの立場から」と題して、ご執筆頂いた。飯田博士らは、抗体医薬品であるモガムリズマブの臨床試験を担当された。本薬はヒト T 細胞白血病細胞上のケモカイン受容体である CCR4 に対するモノクローナル抗体であり、同時に有効性を高めるための腫瘍細胞での CCR4 発現を検査するコンパニオン診断薬も承認されている。本稿では、モガムリズマブの作用機序と臨床効果、さらに皮膚毒性について概説頂き、さらに副作用バイオマーカーの意義について、その将来展望を記して頂いた。

市販後の視点については、鹿庭なほ子博士(国立衛研)に「ゲノムバイオマーカーの市販後安全対策

への応用」と題し、抗がん剤の副作用や重篤副作用と関連するバイオマーカー及びこれらのバイオマーカーの国内外の利用状況、市販後の医薬品安全性予測におけるバイオマーカー利用の有用性を証明する前向き試験などを紹介頂いた。また、市販後における医薬品の安全性向上に向けて、バイオマーカーの利用をさらに推進していくために必要な検討課題に関して、指摘頂いている。

最後に、石黒昭博博士(PMDA)には、「医薬品評価におけるバイオマーカー利用に向けた PMDA の取り組み」を執筆頂いた。バイオマーカーの適格性や医薬品開発における利用を評価する立場から、医薬品評価においてバイオマーカーを活用するために残された課題について言及頂いた上で、最近の PMDA の取り組みを紹介頂いた。

今後は、産学官が共同して、わが国におけるバイオマーカー研究を活性化させ、臨床応用を目指すことが必要であり、本シンポジウムがその一助となることを、オーガナイザー一同、期待するものである。

