

氏 名 (本籍) 岸^{きし} 川^{かわ} 幸^{ゆき} 生^{なが}

学 位 の 種 類 博 士 (医療薬学)

学 位 記 番 号 薬 博 (医療薬学) 第 1 号

学位授与年月日 平 成 15 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科、専攻 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 医療薬科学専攻

学 位 論 文 題 目

薬剤反応性に影響を及ぼす遺伝子多型解析と副作用発現回避に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 後 藤 順 一

教 授 山 添 康

教 授 安 齋 順 一

論文内容要旨

近年、低用量で薬効を発現する医薬品が数多く開発され、治療に貢献している一方、副作用による弊害も少なくない。薬物療法時における副作用発現は、治療を妨げ、患者の身体的、精神的苦痛を伴うばかりでなく、さらなる医療費の増大など深刻な社会問題となっている。副作用を防ぐには、科学的な根拠に基づいた薬物療法を推進し、個々の患者に応じた医薬品の適正使用が重要である。この一環として、薬効や副作用発現に関与する薬物代謝酵素や薬物標的分子等の遺伝子多型が、薬物療法に重要な情報をもたらすものとして注目されている。現在までにcytochrome P 450 (CYP) を始めとする様々な薬物代謝酵素や薬物標的分子のsingle nucleotide polymorphism (SNP)が発見されており、これらが原因となる副作用発現や薬物血中濃度の変化が報告されている。しかし、年齢、肝機能障害の有無及び薬物相互作用等、患者の背景によって、遺伝子型から予想される薬物体内動態と実際のそれ（表現型）が一致しないことも報告されている。そのため、遺伝子多型情報を臨床の現場で応用し、適正な薬物療法を行うためには、多種の薬物代謝酵素、薬物標的分子の遺伝子多型の情報を同時に迅速かつ正確に収集し、さらにそれら遺伝子型と表現型の相関性の検討を行う必要がある。

isoniazid (INH) は、現在最も汎用されている抗結核薬であるが、副作用発現には個人差があることが知られている。この一因として、INHの主要代謝酵素であるN-acetyltransferase 2 (NAT2) の遺伝子多型による酵素活性の差が推測されている。体内でINHはFig.1のごとく代謝されるが、NAT2遺伝子多型が存在する場合、INH及びその代謝産物の量的な変化が予測される。NAT2遺伝子の多型は数多く報告されており、INHの代謝遅延が予想される頻度が高いことから、INHの副作用を回避するためには、NAT2遺伝子診断を行い、さらにINHの表現型を併せて評価することが効果的である。しかし、現在までに、遺伝子多型を検出するための様々な手法が報告されているが、臨床で運用可能な、簡易、迅速かつ正確な遺伝子診断システム構築は未だ十分に検討されていない。

そこで本研究では、個別化医療を推進するための支援システムの構築を目的として、簡易かつ迅速な遺伝子診断システムの確立と臨床での応用を検討した。

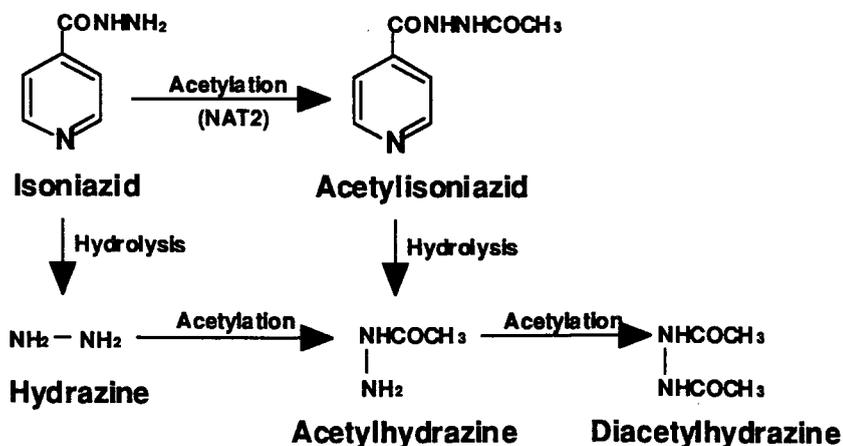


Fig. 1 Metabolic pathway of isoniazid.

まず、Allele Specific Real-Time PCR (AS Real-Time PCR) 法を構築した。本法は、Allele Specific (AS) -プライマーと2種類の蛍光色素をラベルしたオリゴヌクレオチドである TaqMan プローブを用いて PCR を行うことにより、変異型あるいは野生型アレルに対して各々特異的に生じる DNA 増幅に由来する蛍光強度の増をリアルタイムで検出し、遺伝子型を決定するものである。本法による 192 人のゲノム DNA の NAT2 遺伝子型診断の結果は、従来法である Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) 法による遺伝子診断の結果と完全に一致し、本法の正確性が示された。さらに、PCR-RFLP 法が診断までに 6~24 時間必要であるのに対して AS Real-Time PCR 法は 2 時間 20 分で診断が可能であった。

次に本法を用いて、102 例の INH (300 mg/day/twice a week) 服用患者の投与 3 時間後の血液から、4 種の NAT2 遺伝子〔NAT2*4 (野生型), NAT2*5 (変異型), NAT2*6 (変異型) 及び NAT2*7 (変異型)〕を分析し、副作用との相関性を検討した。遺伝子型は、野生型のホモ接合体を RA 型、野生型と変異型のヘテロ接合体を IA 型、変異型のヘテロ接合体及びホモ接合体を SA 型と分類した。患者の診断結果は、RA 型が 52.9%、IA 型が 41.2%、SA 型が 5.9% であった。NAT2 遺伝子型と副作用との相関を検討した結果、SA 型の 83.3% に悪心・嘔吐、末梢神経障害、視力障害、発熱の副作用症状が認められた。これらの症状は INH の中止または減量で消失したことから INH 由来の副作用と考えられた。この結果より、SA 型の遺伝子型では、日本人の INH の常用量である 300mg/day を投与すると、副作用発現の危険性が高いと考えられた。今後、INH 投与前に NAT2 遺伝子多型を診断することで、副作用を未然に回避できる可能性があると考えられた。

引き続き、45 例の患者について、INH とその代謝産物である acetylisoniazid (AcINH), hydrazine (Hz) 及び acetyl hydrazine (AcHz) の血漿中濃度を Seifart らの方法を改変した HPLC 法で測定し、NAT2 遺伝子型との相関性を検討した。その結果、RA 型は、IA 型や SA 型に比べ血漿中 INH 濃度は低く、INH のアセチル化の程度を示す AcINH/INH 比は高値を示した。また、これらの 3 つの遺伝子型群において、1 検体当たりの INH, AcINH, Hz 及び AcHz の和は、RA 型では 7.8, IA 型では 8.0, SA 型では 2.8 と差が認められた。特に低値である SA 型では、他の代謝産物が生成している可能性も示唆された。さらに、これらの血漿中濃度と副作用との相関性を検討した結果、AcINH/INH 比が低値であると副作用発現の傾向が認められ、INH による副作用回避にも遺伝子型と表現型の検討を行うことが重要であると考えられた。これらの知見は、今後 INH を用いた薬物療法における個別化医療の推進に有用な情報を寄与すると考える。

次に、AS Real-Time PCR 法よりさらに迅速な遺伝子診断法を探索すべく、LightCycler を用いた Hybridization Probe 法を用いて、複数の SNP を同一反応条件で検出する遺伝子診断システムを構築した。本法は、まず、フォワード、リバースの 2 つのプライマーと、それぞれ蛍光色素をラベルしたアンカープローブと変異検出プローブを用いて PCR を行う。PCR 終了後、40℃付近まで温度を下げ、ゆっくりと温度を上昇させることにより、変異検出プローブが解離し、二つの蛍光色素が遊離し、蛍光の変化が生じる。SNP が存在しない場合、プローブの解離はより高い温度で起こるため、融解温度 (Tm) 値が変化し、発蛍温度に差が生じる。この現象を利用して SNP を検出する。

本法を用いて、薬物標的分子である inositol polyphosphate 1-phosphatase (INPP1), β 2-adrenoceptor (ADRB2), 5-hydroxytryptamine 2A receptor (HTR2A)及び mitochondrial DNA (mtDNA)の4種類の遺伝子の5種類のSNP検出法を検討した。その結果、すべての反応系において、野生型ホモ接合体と変異型ホモ接合体はそれぞれ固有のT_m値を示し、ヘテロ接合体では野生型と変異型両方のピークを有する二峰性となった。この検出結果は、AS Real-Time PCR法を用いて決定した遺伝子型とすべて一致した。また、5種類のSNPはすべて同一の検出条件で測定可能であった。本法とAS Real-Time PCR法との比較検討したところ、一個人の検体に対して6種類のSNPを検出した場合、AS Real-Time PCR法ではサンプル調製から遺伝子型の判定まで2時間35分要したのに対し、本法では1時間10分ですべての操作が終了した。次に一種類のSNPについて多検体(48サンプル)の遺伝子診断をした場合、AS Real-Time PCR法は2時間35分要したのに対して、本法は2時間45分を要した。これらの結果から、一個人において多種類のSNPを検出するにはHybridization Probe法が適しており、一種類のSNPを多数の人に対して検出するにはAS Real-Time PCR法が適していると考えられた。

今回構築した簡易迅速遺伝子多型検出システムは、その特徴から臨床の場で広く利用されるものと期待される。今後このような薬物反応に関与する遺伝子の多型情報を整備し、表現型と併せて評価することで、薬剤効果の予測、重篤な副作用の防止及び医療費削減が可能になり、医療の質的向上に貢献できると考える。

審査結果の要旨

今日、低用量で高い薬理効果を発現する医薬品が次々と開発、市販され臨床に提供されている。一方、その薬理効果の発現は、遺伝的要因に大きく左右される。とりわけ薬物代謝酵素に関わる遺伝子多型は、時として重篤な副作用を発現する原因となることから、適切な薬物療法の個別化において、その解析が極めて重要となる。本研究は、臨床の場という環境から得られた事実を基に、臨床により有用な薬物代謝酵素の single nucleotide polymorphism (SNP) 解析法の開発を試みたものである。

まず、抗結核薬 isoniazid (INH) の代謝に重要な役割を果す N-acetyltransferase 2 (NAT2) に着目し、Allele Specific (AS) プライマーと2種類の蛍光色素をラベルしたオリゴヌクレオチド (TaqMan プローブ) を用いる Allele Specific Real-Time PCR (AS Real-Time PCR) 法を構築した。本法では変異型、野生型アレルに対してそれぞれ特異的に生じる DNA 増幅に基づく蛍光強度の変動を検出し、遺伝子型を決定する。次いで192人のゲノム DNA を測定したところ、従来 PCR-RFLP 法に比し、測定時間が極めて短く、しかも完全に一致する結果の得られることが判明し、本法の正確性、簡便性、有用性が立証された。そこで、102例の INH 服用患者の NAT2 遺伝子4種を測定し、副作用との相関性に吟味を加え、全体の5.9%を占める変異型のヘテロ及びホモ接合体に副作用の発現することを認めた。このことは、同時に HPLC にて測定した血中代謝産物の濃度ともよく相関し、本法が INH 投与による薬物療法の個別化医療に大いに役立つことが明かとなった。

引き続き、1患者の複数の遺伝子の迅速解析を目的とし、LightCycler を用いる Hybridization Probe 法による SNP 解析法を新たに構築した。本法では、フォワード、リバースの2種のプライマーと、それぞれ蛍光色素をラベルしたアンカープローブと変異検出プローブを用いる。薬物標的分子である inositol polyphosphate 1-phosphatase, β 2-adrenoceptor, 5-hydroxytryptamine 2A receptor, mitochondrial DNA の4種類、計5種類の SNP を測定したところ、従来報告されている結果と完全に一致した。尚、測定時間は AS Real-Time PCR の半分であり、多種類の SNP を同時に測定する時、極めて有用であることが判明した。

以上、本研究により開発した遺伝子多型検出システムは、臨床の場で広く適用され、個別化医療に大いに役立つものと期待される。よって、本論文は博士 (医療薬学) の学位論文として合格と認める。