

氏 名 (本籍) あが つま やす ゆき
我 妻 恭 行

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 第 4 5 5 号

学位授与年月日 平 成 14 年 3 月 4 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 題 目 薬物代謝酵素遺伝子多型の簡易迅速検出法に関する
研究

論文審査委員 (主 査)
教授 水 柿 道 直 教授 榎 本 武 美

教授 山 添 康

論文内容要旨

ある薬物を同じ用量・用法で投与しても、その薬物に対する効果や副作用の現れ方が個人によって著しく異なることがある。このような薬物に対する反応性の個人差は、年齢、性、環境、疾患など多くの因子が関与するが、中でも遺伝的要因が非常に重要な因子の一つであることが明らかにされてきている。薬剤反応性に関する遺伝的要因には、薬物体内動態に影響する薬物代謝酵素や輸送タンパクの欠損、薬効発現に直接影響する受容体タンパク等の欠損が知られているが、特に、薬物代謝酵素の遺伝的欠損は、その酵素で代謝される薬物の体内消失を低下させるため、その薬理作用や副作用の発現に大きな影響をもたらす。例えば、チトクローム P450 (CYP) 分子種の一つである CYP2D6 の酵素活性が低下した患者に、その基質薬物である降圧薬デブリソキンや β 受容体拮抗薬メトプロロールを常用量で投与すると、過剰な薬効や副作用が発現しやすいことが知られている。同様の事例が CYP2C9, CYP2C19 でも報告されている。また、CYP 以外の薬物代謝酵素としてはチオプリン S-メチルトランスフェラーゼ (TPMT), N-アセチルトランスフェラーゼ2 (NAT2) やアルデヒドデヒドロゲナーゼ2 (ALDH2) においても多数の遺伝子多型に関する報告がある。個々の患者について、薬物代謝酵素の遺伝子多型情報を事前に把握することができれば、薬物を投与する前にその患者の薬物体内動態を予測し、最適な薬物の選択や投与量の調整が可能となる。これにより治療効果の向上や副作用発現を防止することが期待できる。現在までに、遺伝子多型を検出するための様々な技術が研究室レベルで報告されているが、実際に臨床で遺伝子診断を行い、適正な薬物療法の評価に応用している施設は非常に少ない。これは、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が成熟していないことが原因と考えられる。すなわち、これまでに Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP), Amplification Refractory Mutation System (ARMS) 等の遺伝子多型検出法が開発されているが、これらの方法は繁雑な操作を要するため判定までに時間を要する。また、診断の際、ゲル電気泳動パターンから視覚的判断を要するため、測定者の熟練が必要である等の問題を有していた。そこで、本研究では、臨床で利用可能な（特に外来患者の遺伝子診断にも応用できるような）薬物代謝酵素の簡易、迅速かつ正確な遺伝子診断システムを開発する目的で以下の検討を行った。

第1章では、対立遺伝子特異的増幅法と TaqMan PCR 法を組み合わせた Allele-Specific (AS)-TaqMan PCR 法を開発し、この方法を用いた CYP2C18m2 および CYP2C18m1 の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism ; SNP) 同時検出システムを確立した。AS-TaqMan PCR 法は、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起きる DNA 増幅を、蛍光強度の増大としてリアルタイムで検出するシステムである。本章では、まず、従来法である PCR-RFLP 法を用いて日本人集団 144 人の血液由来ゲノム DNA について CYP2C18 および CYP2C19 の遺伝子診断を行った。その結果、CYP2C19*1, *2 および*3 のアレル頻度は各々、61.1%, 14.6% および 24.3% であった。また、CYP2C18 と CYP2C19 のそれぞれのアレルがリンクしていることが確認された。つまり、CYP2C19*1 は CYP2C18wt に、CYP2C19*3

は *CYP2C18m1* に、*CYP2C19*2* は *CYP2C18m2* に対応していることが判明した。この結果は、少なくとも日本人集団においては *CYP2C18* の遺伝子型を診断することにより *CYP2C19* の遺伝子型も間接的に診断できることを示唆するものであった。次に AS-TaqMan PCR 法を用いた *CYP2C18m1* および *m2* の SNP 検出法の開発を行った。PCR の反応条件は両者とも、熱変性相：95℃で15秒、アニーリングおよび伸長反応相：60℃で60秒、これらを50サイクル行った。最初にデザインした AS-プライマーは野生型および変異型アレルに各々相補的な塩基配列をもつものであったが、これらを用いて AS-TaqMan PCR 法を行うと、どの遺伝子型のゲノム DNA に対しても全てヘテロ接合体を表す増幅パターン（プロファイル）を示し、正しい診断を行うことができなかった。そこで、AS-プライマーの特異性を向上させるために、オリゴヌクレオチドの3'端から-2位の位置に人為的にミスマッチ塩基を導入したプライマーを作製した。これを用いて AS-TaqMan PCR 法を行ったところ、野生型アレルホモ接合体、変異型アレルホモ接合体、野生型/変異型アレルヘテロ接合体で、各々想定された通りの特徴的なプロファイルが得られた。AS-TaqMan PCR 法では、遺伝子増幅を蛍光強度の変化 (ΔRn 値) として検出されるが、この ΔRn 値に適当な閾値を設定すると、DNA 増幅の起こりやすさの指標となる threshold cycle (Ct) が得られる。このことを利用して、野生型 AS-プライマーを用いたときの増幅曲線から得られる Ct 値を Ctwt, 変異型 AS-プライマーを用いたときの増幅曲線から得られる Ct 値を Ctmt とし、その差 (Grwt-Ctmt) から遺伝子型を判定した。本章では、 ΔRn の閾値を *CYP2C18m1* では0.009, *CYP2C18m2* では0.200とし、Gtw-Ctmt 値が-3<であれば野生型アレルホモ接合体、-3~3であれば野生型/変異型アレルヘテロ接合体、3<であれば変異型アレルホモ接合体と判定した。これらの判定基準に従い、先に PCR-RFLP 法で遺伝子型を明らかにした144人のゲノム DNA について AS-TaqMan PCR 法による遺伝子診断を行ったところ、両者の診断結果が完全に一致し、本法の正確性が証明された。また、AS-TaqMan PCR 法は唾液由来ゲノム DNA でも診断が可能であった、さらに、PCR-RFLP 法が診断までに6~8時間必要であるのに対して AS-TaqMan PCR 法は2時間20分で診断が可能であり、また、一度の反応で複数の遺伝子多型を診断できることから、臨床応用への有用性が示唆された。

第2章では、薬物代謝に重要な役割を果たし、かつ薬物療法上、遺伝子多型が問題となる *CYP2C9* (*CYP2C9*2,*3*), *CYP2C19* (*CYP2C19*2,*3*), *CYP2D6* (*CYP2D6*4,*5,*10,*14,*18,*21*), *TPMT* (*TPMT*3C*), *NAT2* (*NAT2*5,*6,*7*) および *ALDH2* (*ALDH2*2*) の遺伝子多型を同時に検出できるシステムの確立について検討した。本章では、まず、日本人集団のゲノム DNA について従来法である PCR-RFLP 法あるいは ARMS 法を用いて、これらのバリエーションアレルの検出を行った。その結果、各々のバリエーションアレルの頻度は、*CYP2C9*2* および **3* が 0 および 4.2% (n=216) であり、以下、*CYP2C19*2* および **3* は 26.5 および 12.3% (n=151), *CYP2D6*4,*5,*10,*14,*18* および **21* は 0.15, 5.09, 36.38, 0.15, 0.75 および 0.3% (n=334), *TPMT*3C* は 0.8% (n=192), *NAT2*5,*6* および **7* は 0.8, 20.3%, 9.9% (n=192), *ALDH2*2* は 20.8% (n=48) であった。次に、これらのバリエーションアレルに対する AS-TaqMan PCR 法を用いた遺伝子多型検出法の開発を行った。まず、各々の変異型アレルを検出するための AS-プライマーおよび TaqMan プロンプを作製

した。第1章と同様に、AS-プライマーのうちのいくつかには、特異性向上の目的で3'端から-2位の位置に人為的なミスマッチ塩基を導入した。なお、全欠損型遺伝子多型である *CYP2D6**5 のみは適当な検出系が設計できなかった。PCRの温度条件は全て、熱変性相：95℃で10秒、アニーリング・伸長反応相：60℃で35秒、これを40サイクル行った。これらの反応条件で、先に従来法を用いて遺伝子型を明らかにしたゲノムDNA各8検体について、AS-TaqMan PCR法を用いて遺伝子診断を行った。判定基準は、 ΔR_n の閾値を0.2としたときのCt値からCtwt-Ctmt値を求め、第1章と同様に遺伝子型を判定した。その結果、AS-TaqMan PCR法の診断結果は、従来法による結果と全て一致し、本法の遺伝子診断法としての妥当性が立証された。更に、判定までの所要時間を1時間40分に短縮することができた。また、本章ではAS-TaqMan PCR法がSNP型遺伝子多型の検出のみならず、挿入型遺伝子多型 (*CYP2D6**18 および *21) の検出も可能であることが示された。

第3章では、遺伝子増幅の指標となる蛍光物質であるTaqManプローブの代わりに、DNA二重鎖のインターカレーターであるSYBR-Green Iを用いたAS-SYBR Green PCR法を開発し、*CYP2C9**3 遺伝子診断のコストダウンおよび操作の簡略化を行った。SYBR Green Iは、二本鎖DNA存在下で光線を照射することにより蛍光を発する色素であり、TaqManプローブより安価で入手することができる。この方法を用いて、*CYP2C9*の遺伝子型が既知のゲノムDNAサンプルについて遺伝子診断を行った。ただし、今回採取したサンプル中には*CYP2C9**3ホモ接合体が検出されなかったため、その代用として変異部位の遺伝子片を切り出し、それをプラスミドに導入した人工的*CYP2C9*アレル (p*CYP2C9**1, p*CYP2C9**3) を作成した。これらについてAS-SYBR Green PCR法で遺伝子診断を行ったところ、想定された通りの増幅プロファイルが得られ、*CYP2C9*の遺伝子診断が可能であることが示唆された。

以上、本研究を要約すると、対立遺伝子特異的増幅法とTaqMan PCR法を組み合わせたAS-TaqMan PCR法を開発し、この方法を用いた*CYP2C18m1, m2, CYP2C9**3, *CYP2C19**2, *3, *CYP2D6**4, *10, *14, *18, *21, *TPMT**3C, *NAT2**5, *6, *7 および *ALDH2**2の同時遺伝子多型検出法を確立した。また、蛍光標識物質としてTaqManプローブに比較して安価なSYBR Green Iを用いたAS-SYBR Green PCR法を開発し、この方法を用いた*CYP2C9**3アレルの検出法を確立した。AS-TaqMan PCR法およびAS-SYBR Green PCR法は操作が簡単、迅速かつ正確な遺伝子多型検出法であり、臨床応用への有用性が示唆された。

審査結果の要旨

薬物反応性の個体差の原因として、薬物代謝酵素や薬物受容体タンパクの遺伝的多型が重要であることが近年明らかにされてきている。なかでも薬物代謝酵素の遺伝子多型は、その酵素で代謝される薬物の体内消失に影響し、薬理作用や副作用の発現に大きな影響をもたらす。これらの薬物代謝酵素の遺伝子多型情報を事前に把握することができれば、薬物投与前に患者の薬物体内動態を予測し、最適な薬物療法の一助となる。しかし、現在のところ簡易、迅速な遺伝子多型検出法が開発されていないため、一般の臨床施設では遺伝子多型診断をルーチンで行うことは困難であった。そこで本研究では、蛍光プローブを用いたリアルタイム遺伝子多型検出法を応用した、薬物代謝酵素の簡易、迅速遺伝子多型検出法の開発と応用について検討し、以下の新規知見を報告した。

- ・対立遺伝子特異的増幅法と蛍光オリゴヌクレオチド (TaqMan Probe) を組み合わせた Allele Specific-TaqMan PCR (AS-TaqMan PCR) 法を用いた、*CYP2C18m1*, アレル及び *CYP2C18m2* アレルの同時検出法を開発した。この方法を用いた診断結果が従来法によるものと完全に一致することを示し、診断結果の信頼性を明らかにした。また、従来法に比較して診断時間を著しく短縮できること、さらに、結果を数値化することにより客観的に遺伝子診断が可能であることを示した。

- ・薬効発現に影響を及ぼし、臨床上解析が必要と考えられる *CYP2C9* (*CYP2C9*2*, **3*), *CYP2C19* (*CYP2C19*2*, **3*), *CYP2D6* (*CYP2D6*4*, **10*, **14*, **18*, **21*), *TPMT* (*TPMT*3C*), *NAT2* (*NAT2*5*, **6*, **7*) および *ALDH2* (*ALDH2*2*) の AS-TaqMan PCR 法を用いた遺伝子多型同時検出システムを確立した。

- ・蛍光プローブとして TaqMan Probe の代わりに DNA 二重鎖のインターカラーターである SYBR-Green I を用いた AS-SYBR Green PCR 法を開発し、*CYP2C9*3* アレルの検出法を確立した。これにより診断のコストダウンおよび操作の簡略化を行った。

以上、本研究は、薬理遺伝学的検討から多種薬物代謝酵素の遺伝子多型を簡易・迅速に診断できるシステムを新規に示したものである。これらの結果は、近い将来、臨床で導入されると考えられるパーソナライズドメディスンの展開に有益な知見を示したものであり、薬学において有益な成果であると判断する。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。