

学位論文

薬物代謝関連酵素遺伝子 *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*,
CYP2D6, *CYP3A5* 及び *VKORC1* の高効率的な
遺伝子多型解析法に関する研究

Study for high-performance and straightforward genotyping methods of
drug metabolizing related enzyme genes *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*,
CYP2D6, *CYP3A5* and *VKORC1*

2014 年

大田 智子

目次

緒論	1
第1章 新規ダイレクト TaqMan PCR (TaqMan polymerase chain reaction) 法の開発	4
第1節 唾液検体を用いた新規ダイレクト TaqMan PCR 法の開発	4
第1項 目的	4
第2項 実験方法	4
第3項 結果および考察	5
第2節 <i>CYP1A2</i> , <i>CYP2C9</i> , <i>CYP2C19</i> , <i>CYP2D6</i> , <i>CYP3A5</i> 遺伝子多型の網羅的解析	8
第1項 目的	8
第2項 対象	10
第3項 実験方法	10
第4項 結果および考察	13
第3節 薬物代謝酵素 <i>CYP2C9</i> 及びビタミン K エポキシド還元酵素 <i>1VKORC1</i> の遺伝子多型に関する検討	24
第1項 目的	24
第2項 対象	25
第3項 実験方法	25
第4項 結果及び考察	27
第4節 小括	31

第2章	<i>CYP2D6</i> *5 遺伝子多型に関する検討	32
第1節	プライマー設計及び反応条件の検討	32
第1項	目的	32
第2項	実験方法	33
第3項	結果および考察	37
第2節	日本人における <i>CYP2D6</i> *5 遺伝子多型頻度	40
第1項	目的	40
第2項	対象	40
第3項	実験方法	40
第4項	結果および考察	40
第3節	小括	41
	総括	42
	謝辞	44
	論文目録	45
	参考文献	46

緒論

2003 年にヒトゲノム配列の解読完了以降¹⁾、遺伝子技術の急速な発達に伴い、ゲノム情報に基づいた医療が注目されるようになった²⁾。生命科学分野における研究の著しい進展により、個別化医療の推進、すなわち各個人におけるゲノム情報に基づいた医療への応用が重要な課題となっている。薬物治療において医薬品の効果、副作用には大きな個人差があり、その原因の 1 つとして遺伝子多型が挙げられることは、すでに数多くの研究結果から明らかにされている³⁻⁵⁾。しかし、薬物応答に関わる遺伝子情報が蓄積されてきているにもかかわらず、一部の例を除いてほとんど臨床に応用されていないのが現状である。現在までに、遺伝子多型を検出するための様々な技術が報告されているが、その多くは煩雑な操作を要するため、実際に臨床現場で遺伝子診断を行い、薬物の適正使用・評価を行っている施設は少ない。これは、臨床現場では非侵襲で容易に得られる非血液検体（例えば、唾液など）に適用可能な、迅速・簡易・安価で信頼性の高い遺伝子多型診断システムが成熟していないことが原因のひとつとして考えられる。特に臨床現場では、多量の検体を短時間で処理できる遺伝子診断技術の開発が望まれる。

林田らは、これまでに生体検体から DNA の抽出精製を全く行わない PCR 遺伝子増幅方法の検討を進め、毛根あるいは乾燥ろ紙血の紙片を直接 PCR 反応液に添加する方法を開発した^{6,7)}。この実験法により、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) を解析する方法である Allele Specific Primer-Polymerase Chain Reaction (ASP-PCR) および Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) が DNA 抽出操作なしに解析可

能となった。しかしながら、これらの遺伝子多型解析は、ゲル電気泳動後に PCR 増幅産物のパターンを視覚的に判断するため、測定者の熟練が必要である等の問題を有していた。

そこで本報では、第 1 章にて臨床で応用可能な薬物代謝酵素遺伝子について TaqMan PCR 法を応用した迅速・簡易・安価で信頼性の高い遺伝子解析法を開発した。一般に、リアルタイム TaqMan PCR ジェノタイピング法は、SNP を判定するために設計された 2 種類の蛍光色素をラベル化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⁸⁾。リアルタイム TaqMan PCR 法は、蛍光量を読み取り遺伝子解析を行うため、通常の濾紙では濾紙片が光路を妨害して解析を行うことができない。そこで、唾液検体を採取する濾紙の検討を行い、水溶紙を用いることで反応液中で水溶紙片が比較的短時間で溶解する性質を利用して、唾液を添加した紙片を直接 TaqMan PCR 反応液に入れて解析を行うダイレクト TaqMan PCR ジェノタイピング解析を行うことに成功した。そして新規解析法を用いて、ヒトの薬物代謝に関わるシトクロム P450 (CYP) 酵素の主要な遺伝子 *CYP1A2*、*CYP2C9*、*CYP2C19*、*CYP2D6* 及び *CYP3A5* の遺伝子多型のポピュレーション解析、遺伝子多型を組み合わせた体系的な解析を行った。さらに抗凝固薬ワルファリンの標的酵素である代謝酵素遺伝子 *CYP2C9**3 及びビタミン K 還元酵素複合体 1 遺伝子 *VKORC1* -1639G>A の一塩基多型解析にダイレクト TaqMan PCR 法を応用した。第 2 章では、*CYP2D6**5 の Nested long PCR 法を開発を行った。*CYP2D6**5 は *CYP2D6* 遺伝子が完全欠損しているために、増幅が難しい Long PCR 法を必要とする。また、遺伝子付近にはいくつかの繰り返し配列が見られるため、

primer 設計を行うのは容易ではない。そこで *CYP2D6* 遺伝子付近の配列から、新たに primer を設計し、Long PCR 反応条件の検討、遺伝子頻度解析を行った。

第 1 章 新規ダイレクト TaqMan PCR (TaqMan polymerase chain reaction) 法の開発

第 1 節 唾液検体を用いた新規ダイレクト TaqMan PCR 法の開発

第 1 項 目的

本節では臨床で応用可能な乾燥唾液検体を用いて TaqMan PCR 法を応用した迅速・簡易・安価で信頼性の高い遺伝子多型診断法を開発した。まず、リアルタイム TaqMan PCR 法で遺伝子解析可能な、唾液検体を採取する濾紙の検討を行った。

第 2 項 実験方法

被験者自身がスポイトを使用して口腔内細胞を含む唾液を採取し、水溶紙 (60MDP、日本製紙パピリア(株)) に唾液を滴下後、約 1 時間自然乾燥したものを遺伝子診断の検体として使用した。唾液乾燥検体は、市販の乾燥剤 (シリカゲル等) と共に検体 ID 番号を付したチャック付ポリエチレン袋 (株生産日本社) の中に入れて、室温にて保存管理した。

ダイレクト TaqMan PCR は乾燥唾液検体の 1.20 mm 径紙片を直接 TaqMan PCR 反応液に添加してリアルタイム PCR 法で SNP ジェノタイピングを行った (Fig. 1)。プライマーおよび TaqMan プローブは TaqMan SNP genotyping assays (Life Technologies 社) を用い、装置は ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems 社) を使用した。TaqMan SNP ジェノタイピング反応液は、Thunderbird probe qPCR Mix 10.0 μ L (東洋紡社)、2 \times KOD FX buffer 2.0 μ L (東洋紡社)、50 \times ROX reference dye (東洋紡社) 0.4 μ L、20 \times TaqMan SNP genotyping assays (Life

Technologies 社) 1.0 μ L、滅菌蒸留水 (DW) 6.6 μ L を加え、反応液全量を 20 μ L とした。Applied Biosystems 社の推奨する PCR サイクル条件を採用し、反応は 40 サイクル行った。

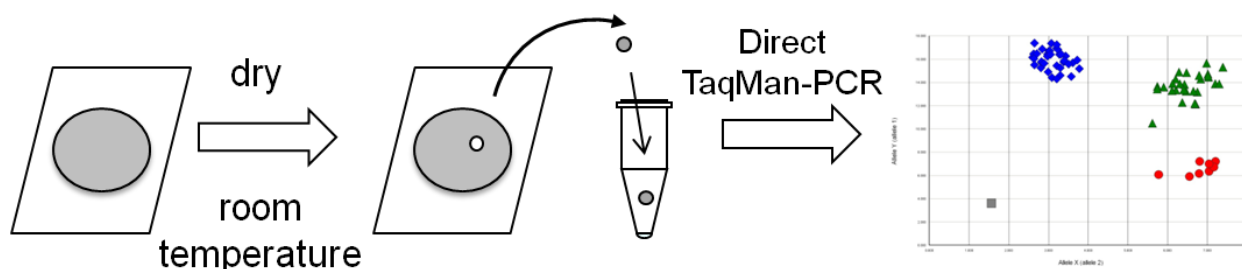


Fig. 1 Outline of the direct TaqMan genotyping method using human dried saliva. The saliva was put onto pieces of water-soluble paper and dry for one hour at room temperature. The dried saliva attached to a piece of water-soluble paper was cut into a 1.20-mm diameter disk and put into the reaction mixture directly.

第3項 結果および考察

ダイレクト TaqMan PCR 法のアウトラインを Fig. 1 に示した。唾液を添加した水溶紙を約 1 時間室温で乾燥することで、検体を安定に保ち長期保存も可能であった（実質約 1 年）。TaqMan PCR 法は、励起した蛍光を読み取り遺伝子解析を行うため、通常の濾紙では、濾紙がレーザー光の通りを阻害し誤判定を招く結果が得られた (Fig. 2B)。そこで、水溶紙に水を加えることで繊維間の結合部分が水中で迅速に形状崩壊し、繊維が分散する性質を利用し⁹⁾、水溶紙に添加した乾燥唾液検体を直接反応液に入れて、蛍光シグナルを阻害せずに解析を行うことに成功した (Fig. 2C)¹⁰⁾。

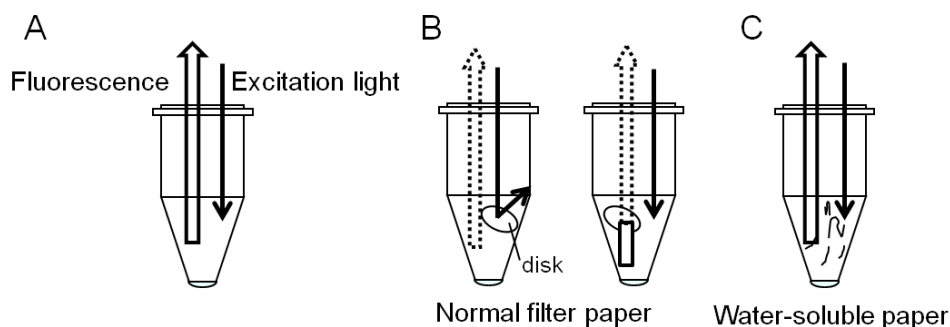


Fig. 2 Detection of the fluorescence signal in the TaqMan PCR analysis.

(A) Outline of the detection of the excitation light and fluorescence signals in the TaqMan PCR analysis. (B) Detection of the fluorescence with normal filter paper. (C) Detection of the fluorescence with water-soluble paper.

また、これまでに血液検体を用いた同様の遺伝子解析法が報告されているが、血液検体は侵襲性を伴い、輸送・保管において問題があった。Table 1 に申請者らが開発した新規解析法と従来の解析法との比較を示した。本研究で用いた乾燥唾液検体は、血液検体と比較して低侵襲であり、唾液を水溶紙に添加して乾燥させることで室温で非常に安定なため、通常郵便にて郵送や、室温での長期保存も可能である（実績約1年）。また唾液検体ではDNA抽出を省くことができ、実験操作中の時間の削減やコンタミネーションを防ぐだけでなく、前処理操作にかかる時間や労力の削減につながる。また、一般廃棄物として扱うことができるため、廃棄も簡便に行え、感染の心配もない。本新規解析法は非常に簡便であるため、すぐにでも臨床現場において実施可能であると考え。特に薬剤師が入院患者と接する場や、最終的には薬局において患者の同意のもと遺伝子検査のためにサンプル採取が可能になると考えている。薬局では遺伝子検査はできないため、Table 1 中の室温保存が通常郵送可能という本実験法の特徴を生かす

ことができる。

また、解析に用いる検体採取紙について本研究で使用した水溶紙、普通濾紙、FTA カード(GE Healthcare 社)の比較表を Table 2 に示した。本研究で用いた水溶紙は、DNA 抽出を必要とせずにダイレクト TaqMan PCR 解析が実施可能であり、さらに DNA 抽出が不要であることから全処理にかかる時間は短く、低コストであるという利点がある。

Table 1 Comparison for genetic analysis methods between this study and blood sample

This study		Blood (liquid)
Invasive	Non-invasive	Invasive
Storage	Room temperature	Require a freezer
Shipping	Mail	Frozen service
DNA extraction	Unnecessary	Necessary
Cost	TaqMan reagent	TaqMan reagent + DNA extraction reagent
Pretreatment time	A few minutes	Several hours
Biohazard	Non-medical waste	Medical waste

Table 2 Comparison for filter papers in the genetic analysis

	Water-soluble paper (NIPPON PAPER PAPYLIA)	Filter paper (ADVANTEC)	FTA card (GE Healthcare Life Sciences)
direct TaqMan PCR	○	×	×
DNA extraction	Unnecessary	Necessary	Unnecessary (Wash require)
Pretreatment time	Short	Medium	Long
Cost (¥/sample)	18	3	733

第2節 *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A5* 遺伝子多型の網羅的解析

第1項 目的

本節では、第1節で開発した新規遺伝子解析法を用いて、薬の代謝に関わる薬物代謝酵素遺伝子解析を日本人 1,017 名の検体を用いて実施した。薬の代謝には CYP が主要代謝酵素として知られている^{11,12)}。CYP 酵素は臨床で使用されている約 80%以上の薬の代謝に関与しており¹³⁾、中でも *CYP1A2*、*CYP2C9*、*CYP2C19*、*CYP2D6*、*CYP3A4/5* の5つの遺伝子は臨床での薬物治療に有用であるとされている¹⁴⁾。主な CYP 酵素の基質となる薬剤を Table 3 に示す。*CYP1A2* はカフェイン、フェニトイン、ドンペリドンなど広い範囲の薬物の代謝に関わっており、臨床において重要な酵素遺伝子である^{15,16)}。また *CYP2C9* は主にワルファリンや、ロサルタン、フェニトインの代謝に関与する^{17,18)}。*CYP2C19* はオメプラゾールやジアゼパム、フェニトインなどの代謝に関与し¹⁹⁻²¹⁾、*CYP2C19* の PM のほとんどは *CYP2C19**2、*3 変異に起因するといわれている。*CYP2D6* はタモキシフェンやコデイン、デキストロメトルファンなどの代謝に関与しており、多くの遺伝子多型が報告されている²²⁻²⁴⁾。*CYP3A5* はタクロリムスやミダゾラムの代謝に関与している^{25,26)}。日本人では *CYP3A4* の遺伝子変異は低いことから、*CYP3A5* が注目されており、中でも *CYP3A5**3 で最も多く変異が確認されている。本研究で解析を行った遺伝子変異について Table 4 に示す。

現在までに、それぞれの薬物代謝酵素関連遺伝子に関する報告は数多くあるが^{27,28)}、日本人において *CYP1A2*、*CYP2C9*、*CYP2C19*、*CYP2D6*、*CYP3A5* の5つの遺伝子の組み合わせに関するコンビネーション解析を実施した報告はなく、さらに 1,000 名以上の検体で実施した例も

ない。そこで、本節ではこれらの *CYP* 遺伝子のポピュレーション解析、さらに遺伝子多型を組み合わせた体系的な解析を行った²⁹⁾。

Table 3 Stratification of medication according to their contribution to the metabolism by major Cytochrome P450 (CYP) isoenzymes

Gene	Drug substrates ³⁰⁻³²⁾
<i>CYP1A2</i>	Caffeine, theophylline, domperidone, olanzapine
<i>CYP2C9</i>	Warfarin, tolbutamide, diazepam, celecoxib, losartan, diclofenac, ibuprofen, naproxen, piroxicam
<i>CYP2C19</i>	Omeprazole, mephenytoin, proguanil, citalopram, amitriptyline, clomipramine, propranolol
<i>CYP2D6</i>	Tamoxifen, amphetamine, codeine, nortryptiline, dextromethorphan, paroxetine, fluvoxamine, haloperidol, propafenone, debrisoquine
<i>CYP3A5</i>	Midazolam, tacrolimus, rifampicin

Table 4 Gene information in the our study

Gene	Chromosome	Variant	NCBI db SNP ID	Defining nucleotide change (s)	Taqman PCR probe ID	Enzyme activity ^a
<i>CYP1A2</i>	15q24.1	*1C	rs2069514	-3860 G>A	C__15859191_30	decreased
<i>CYP2C9</i>	10q23.33	*3	rs1057910	1075 A>C	C__27104892_10	decreased
<i>CYP2C19</i>	10q23.33	*2	rs4244285	681G > A	C__25986767_70	none
		*3	rs4986893	636 G> A	C__27861809_10	none
<i>CYP2D6</i>	22q13.2	*10	rs1065852	100 C>T (188 C>T)	C__11484460_40	decreased
<i>CYP3A5</i>	7q21	*3	rs776746	6986 A>G	C__26201809_30	decreased

^aData available at <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>.

第2項 対象

本学学生に書面による説明を行い、同意が得られた 1,017 名を対象として乾燥唾液検体の提供を受けた。なお、本研究は ヒトゲノム遺伝子解析研究の倫理指針に準拠した武庫川女子大学倫理委員会において承認されている (承認番号: 13-30)。

第3項 実験方法

1. ダイレクト TaqMan PCR 法

解析方法は第1節で開発した、ダイレクト TaqMan PCR 法で行った。TaqMan SNP ジェノタイピング反応液は、Thunderbird probe qPCR Mix 10.0 μ L (東洋紡社)、2 \times KOD FX buffer 2.0 μ L (東洋紡社)、50 \times ROX reference dye (東洋紡社) 0.4 μ L、20 \times TaqMan SNP genotyping assays (Life Technologies 社) 1.0 μ L、滅菌蒸留水 (DW) 6.6 μ L を加え、反応液全量を 20 μ L とした。Applied Biosystems 社の推奨する PCR サイクル条件を採用し、反応は 40 サイクル行った。

2. PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length polymorphism) 法

前述の TaqMan PCR 法による遺伝子診断結果の正確性は、PCR-RFLP 法を用いて検証した。使用した検体は 1,017 検体中の 219 検体を用いた。反応液組成は、2 \times PCR Buffer for KOD FX 7.5 μ L (東洋紡社)、デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTPs) mixture (2 mM each) 1.5 μ L、wach forward primer (10 μ M) 1.0 μ L、each reverse primer (10 μ M) 1.0 μ L、KOD FX Neo 0.3 μ L (東洋紡社)、滅菌蒸留水 (DW) 3.7 μ L を加え、反応液全量を 15 μ L にして、乾燥唾液検体の 1.20 mm 径紙片

を直接反応液に添加した。PCR-RFLP 法の反応条件を Table 5 に示す^{25, 33-35}。

制限酵素処理は、PCR 反応液 6 μ L に Table 5 に示すそれぞれの制限酵素、buffer を用いて、全量 20 μ L の反応液とした。制限酵素処理反応液 20 μ L は MultiScreen[®]-HV (Merck Millipore 社) を使用して遠心濾過 (4°C、1500 rpm、2 分間) により精製した後、試薬キット DNA-1000 を使用し、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA MCE-202 (島津製作所社) を用いて制限酵素処理断片長を確認した。

Table 5 PCR and PCR-RFLP conditions

Gene	PCR forward primer 5'→3'	PCR reverse primer 5'→3'	Thermocycling conditions	Pattern after gel electrophoresis	Detection method
<i>CYP1A2*1C</i>	GCTACACATGATCGAGCT ATAC	CAGGTCTCTTCACTGTAAA GTTA	95°C/5 min 35×95°C/10 s, 60°C/30 s, 74°C/30 s 72°C/2 min	Wt/Wt: 596 bp Wt/Mt: 596 bp, 464 bp, 132 bp Mt/Mt: 464 bp, 132 bp	<i>DdeI</i> for 1hr, 37°C
<i>CYP2C9*3</i>	GCTGTGGTGCACGACGTC CAGAGATGC	ACACACACTGCCAGACACT AGG	95°C/5 min 40×98°C/10 s, 64°C/30 s, 74°C/45 s 72°C/2 min	Wt/Wt: 270 bp, 28 bp Wt/Mt: 298 bp, 270 bp, 28 bp Mt/Mt: 298 bp	<i>NsiI</i> for 1hr, 37°C
<i>CYP2C19*2</i>	AATTACAACCAGAGCTT GGC	TATCACTTTCCATAAAAAGC AAG	95°C/5 min 40×95°C/10 s, 55°C/30 s, 74°C/30 s 72°C/2 min	Wt/Wt: 120 bp, 49 bp Wt/Mt: 169 bp, 120 bp, 49 bp Mt/Mt: 169 bp	<i>SmaI</i> for 1hr, 25°C
<i>CYP2C19*3</i>	TATTATTATCTGTTAACA AATATGA	ACTTCAGGGCTTGGTCAAT ATAG	95°C/5 min 40×95°C/10 s, 55°C/30 s, 74°C/30 s 72°C/2 min	Wt/Wt: 233bp, 96 bp Wt/Mt: 329 bp, 233 bp, 96 bp Mt/Mt: 329 bp	<i>BamHI</i> for 1hr, 37°C
<i>CYP2D6*10</i>	CCATTTGGTAGTGAGGCA GGTAT	CACCATCCATGTTTGCTTC TGGT	95°C/5 min 35×95°C/10 s, 66°C/30 s, 68°C/30 s 68°C/2 min	Wt/Wt: 213bp , 59 bp Wt/Mt: 213 bp, 112 bp, 101 bp, 59 bp Mt/Mt: 112bp, 101 bp, 59 bp	<i>HphI</i> for 2 hr, 37°C
<i>CYP3A5*3</i>	CATGACTTAGTAGACAG ATGA	GGTCCAAACAGGGAAGAA ATA	95°C/5 min 35×95°C/10 s, 56°C/30 s, 74°C/30 s 72°C/2 min	Wt/Wt: 148 bp, 125 bp, 20 bp Wt/Mt: 168 bp, 148 bp, 125 bp, 20 bp Mt/Mt: 168 bp, 125 bp	<i>SspI</i> for 15 min, 37°C

第3項 結果および考察

日本人における *CYP1A2*、*CYP2C9*、*CYP2C19*、*CYP2D6*、*CYP3A5* 遺伝子多型を解析した結果、それぞれの *CYP* 遺伝子における多型頻度は、それぞれ報告されている日本人の分布と有意な差はなかった (Table 6)³⁶⁾。これらの判定結果は、PCR-RFLP 多型診断法による検証実験結果と完全に一致した。このことから TaqMan PCR 法が高精度であることが実証できた。TaqMan PCR 法、PCR-RFLP 法による判定結果を Fig. 3、Fig. 4 に示す。また、*CYP2C9* 遺伝子において、変異型ホモ接合体 (*3/*3) は検出されなかった。*CYP2D6* 遺伝子において、14 検体は *CYP2D6**10 の判定が不可であった。この理由として、遺伝子が欠損を示す *CYP2D6**5 をもつ可能性が考えられた。今後、次章にて開発した Nested long PCR 法を用いて *CYP2D6**5 の遺伝子解析を行う予定である³⁷⁾。本研究で対象とした遺伝子群では *CYP1A2*、*CYP2C9*、*CYP2C19*、*CYP2D6* においては、白人に比べて日本人では変異率が大きく異なる (Table 6)^{36,38)}。遺伝子解析結果より、それぞれの遺伝子型の最頻値は *CYP1A2**1A/*1A (n=593)、*CYP2C9**1/*1 (n=963)、*CYP2C19**1/*2 (n=377)、*CYP2D6**1/*1 (n=387)、*CYP3A5**3/*3 (n=594)であった (Table 7)。一般的に、遺伝子の表現型には 3 つのタイプがあり、代謝能が欠損した個体は poor metabolizer (PM)とよばれ、extensive metabolizer (EM)と比べて、血中濃度の大会状態が長時間続くため必要以上の効果が生じ、副作用が起こりやすい。また EM よりも代謝能が遅い intermediate metabolizer (IM)の個体は、PM と同様に副作用の発現が危惧される³⁹⁾。

Table 6 Allele frequencies of *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* and *CYP3A5* (n=1,017)

Gene	Variant allele	This study	Japanese ³⁶⁾	Caucasian ³⁶⁾
<i>CYP1A2</i>	*1C	0.234	0.319	0.010 ^a
<i>CYP2C9</i>	*3	0.027	0.035	0.056
<i>CYP2C19</i>	*2	0.295	0.345	0.136 ^a
<i>CYP2C19</i>	*3	0.111	0.090	0.000 ^a
<i>CYP2D6</i>	*10	0.427	0.435	0.196 ^a
<i>CYP3A5</i>	*3	0.762	0.780	0.955 ^a

^a Significantly different ($P < 0.05$) mean allelic frequency compared with this study mean (Pearson's chi-square test).

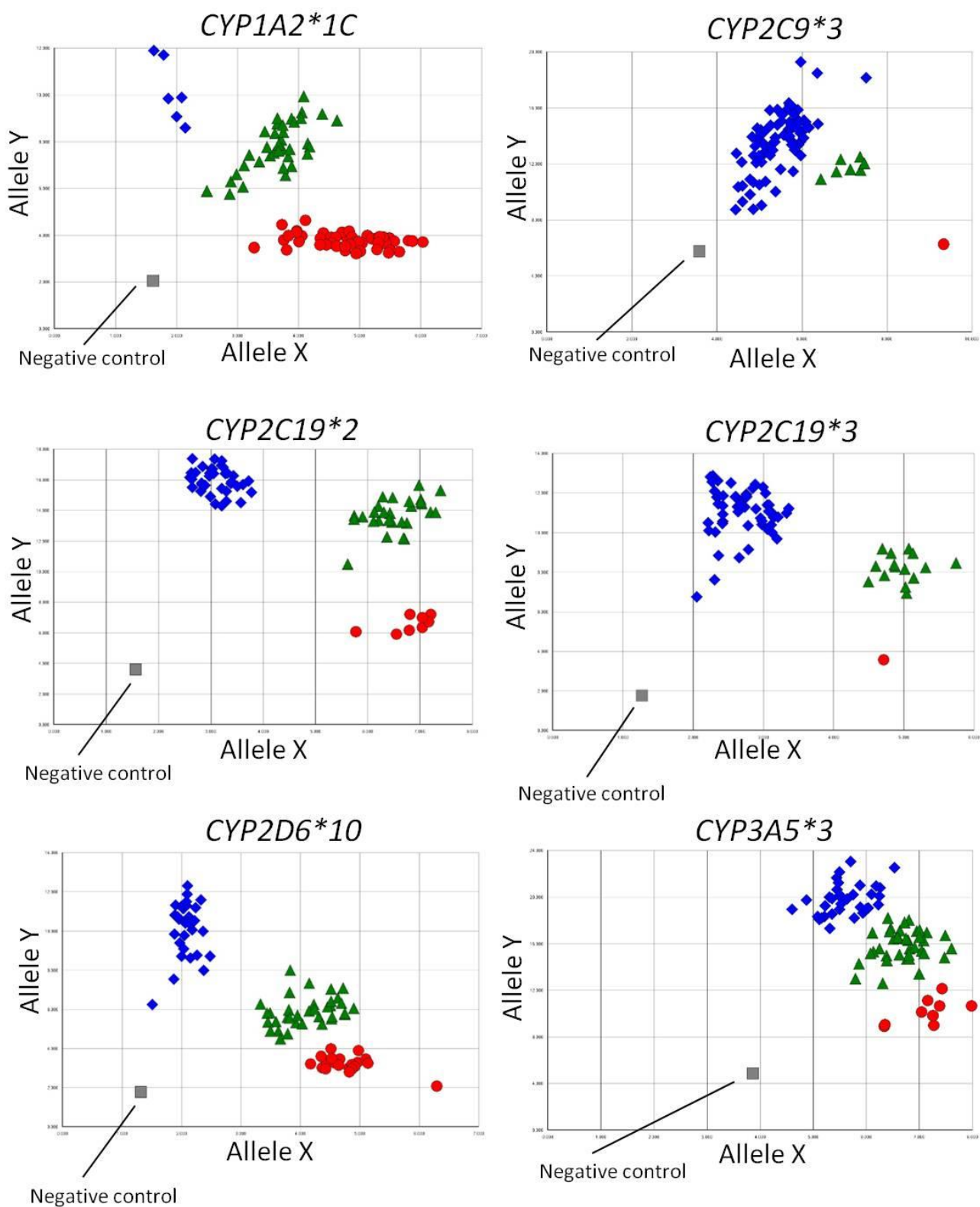


Fig. 3 Results of *CYP1A2*1C*, *CYP2C9*3*, *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3*, *CYP2D6*10* and *CYP3A5*3* genotypes by direct TaqMan PCR analysis.

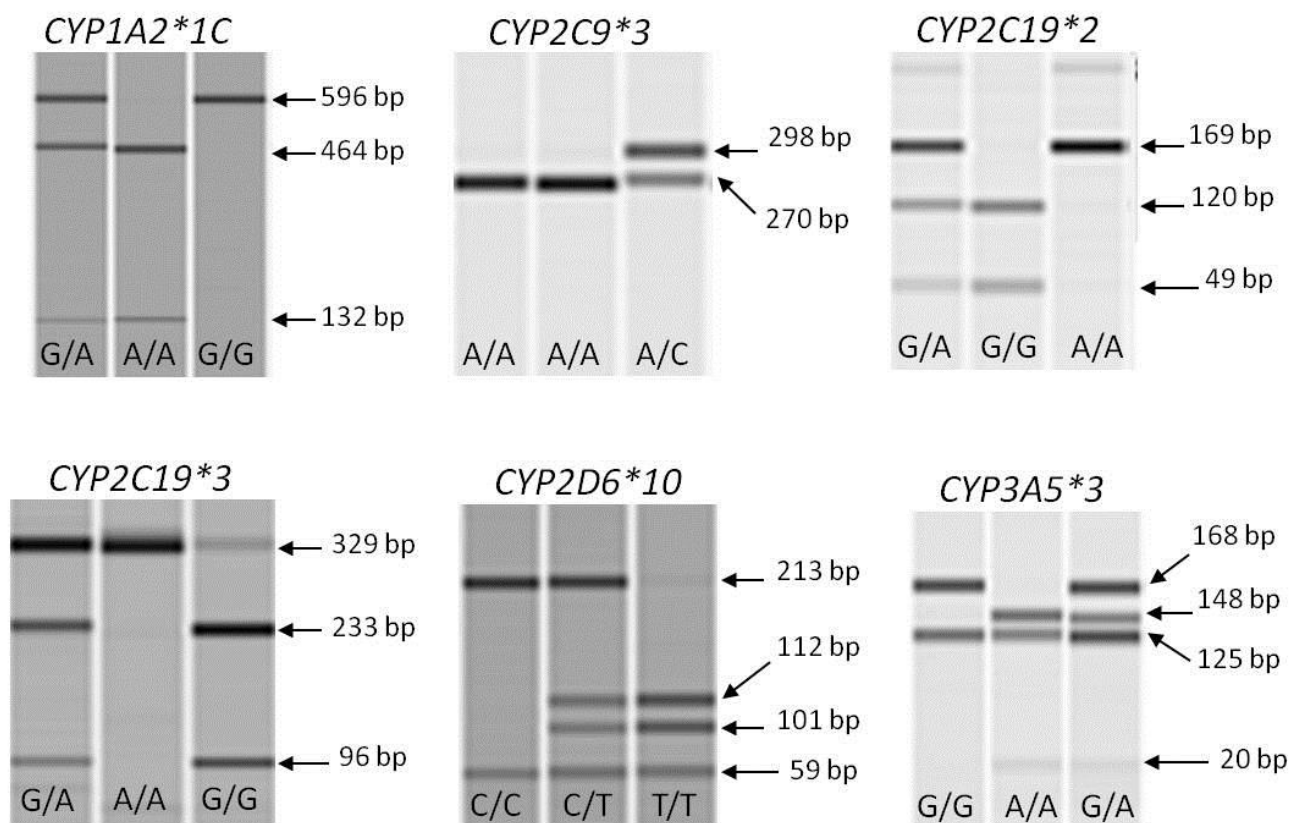


Fig. 4 Automated microchip electrophoresis detection of *CYP1A2*1C*, *CYP2C9*3*, *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3*, *CYP2D6*10* and *CYP3A5*3* genotypes by PCR-RFLP analysis.

それぞれの *CYP* 遺伝子多型結果を組み合わせて解析を行った結果、5 遺伝子 (6 多型) の全ての組み合わせは 483 通りが考えられるが、1,003 名 (*CYP2D6*10* 検出不可の 14 検体を除いてある) のコンビネーション解析では 139 通りの組み合わせが認められた (Table 8)。それぞれの遺伝子多型の組み合わせをもつ群の存在率 (比) の多くは 1%以下であったが、30 の組み合わせで 1%以上の群を確認できた (Table 9)。その中でもっとも多い組み合わせをもつ群は Table 8 の No. 10 に示す 5.1%であった。それぞれの遺伝子における最頻値の組み合わせは No. 8 の 3.7%であった。このことから特定の組み合わせのポピュレーションはわずか

1,000 名でも全体の約 1/3 の 139 通りの組み合わせが見られたことより、非常に多様性に富むことが明らかとなった。この結果から、最適な治療を行うためには、個々の遺伝子多型にあった治療を行っていく必要性があり、今後これらのデータを個別化医療につなげることができると考えている。

Table 7 Genotype frequencies of *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* and *CYP3A5* in the Japanese population (n=1,017)

Gene	Genotypes	Phenotypes	Number of subjects	Observed frequency (%)
<i>CYP1A2</i>	<i>*1A/*1A^a</i>	EM	593	58.3
	<i>*1A/*1C</i>	IM	372	36.6
	<i>*1C/*1C</i>	PM	52	5.1
<i>CYP2C9</i>	<i>*1/*1^a</i>	EM	963	94.7
	<i>*1/*3</i>	IM	54	5.3
	<i>*3/*3</i>	PM	0	0
<i>CYP2C19</i>	<i>*1/*1</i>	EM	345	33.9
	<i>*1/*2^a</i>	IM	377	37.1
	<i>*1/*3</i>	IM	142	14.0
	<i>*2/*2</i>	PM	80	7.9
	<i>*2/*3</i>	PM	63	6.2
	<i>*3/*3</i>	PM	10	1.0
<i>CYP2D6</i>	<i>*1/*1^a</i>	EM	387	38.1
	<i>*1/*10</i>	IM	375	36.9
	<i>*10/*10</i>	IM	241	23.7
	Undefined		14	1.4
<i>CYP3A5</i>	<i>*1/*1</i>	EM	61	6.0
	<i>*1/*3</i>	IM	362	35.6
	<i>*3/*3^a</i>	PM	594	58.4

a : A major mode of genotype

Table 8 The total 139 kinds of combined genotype frequency in Japanese populations (n=1,003)

Genotype							
No.	<i>CYP1A2</i>	<i>CYP2C9</i>	<i>CYP2C19</i>	<i>CYP2D6</i>	<i>CYP3A5</i>	Subject	%
1	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	2	0.2%
2	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*3	33	3.3%
3	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*3/*3	44	4.4%
4	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*1/*10	*1/*1	3	0.3%
5	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*1/*10	*1/*3	23	2.3%
6	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*1/*10	*3/*3	25	2.5%
7	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*10/*10	*1/*1	3	0.3%
8	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*10/*10	*1/*3	17	1.7%
9	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*10/*10	*3/*3	25	2.5%
10	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*1/*1	*1/*1	3	0.3%
11	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*1/*1	*1/*3	35	3.5%
12	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*1/*1	*3/*3	37	3.7%
13	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*1/*10	*1/*1	8	0.8%
14	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*1/*10	*1/*3	27	2.7%
15	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*1/*10	*3/*3	51	5.1%
16	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*10/*10	*1/*1	1	0.1%
17	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*10/*10	*1/*3	18	1.8%
18	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*10/*10	*3/*3	30	3.0%
19	*1A/*1A	*1/*1	*1/*3	*1/*1	*1/*1	1	0.1%
20	*1A/*1A	*1/*1	*1/*3	*1/*1	*1/*3	8	0.8%
21	*1A/*1A	*1/*1	*1/*3	*1/*1	*3/*3	21	2.1%
22	*1A/*1A	*1/*1	*1/*3	*1/*10	*1/*1	2	0.2%
23	*1A/*1A	*1/*1	*1/*3	*1/*10	*1/*3	11	1.1%
24	*1A/*1A	*1/*1	*1/*3	*1/*10	*3/*3	17	1.7%
25	*1A/*1A	*1/*1	*1/*3	*10/*10	*1/*1	2	0.2%
26	*1A/*1A	*1/*1	*1/*3	*10/*10	*1/*3	5	0.5%
27	*1A/*1A	*1/*1	*1/*3	*10/*10	*3/*3	10	1.0%
28	*1A/*1A	*1/*1	*2/*2	*1/*1	*1/*3	8	0.8%
29	*1A/*1A	*1/*1	*2/*2	*1/*1	*3/*3	11	1.1%
30	*1A/*1A	*1/*1	*2/*2	*1/*10	*1/*1	1	0.1%
31	*1A/*1A	*1/*1	*2/*2	*1/*10	*1/*3	3	0.3%
32	*1A/*1A	*1/*1	*2/*2	*1/*10	*3/*3	11	1.1%
33	*1A/*1A	*1/*1	*2/*2	*10/*10	*1/*3	9	0.9%
34	*1A/*1A	*1/*1	*2/*2	*10/*10	*3/*3	5	0.5%

35	<i>*1A/*1A</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*2/*3</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	4	0.4%
36	<i>*1A/*1A</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*2/*3</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*3/*3</i>	5	0.5%
37	<i>*1A/*1A</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*2/*3</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*1</i>	1	0.1%
38	<i>*1A/*1A</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*2/*3</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*3</i>	8	0.8%
39	<i>*1A/*1A</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*2/*3</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*3/*3</i>	8	0.8%
40	<i>*1A/*1A</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*2/*3</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*1/*1</i>	1	0.1%
41	<i>*1A/*1A</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*2/*3</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*1/*3</i>	3	0.3%
42	<i>*1A/*1A</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*2/*3</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*3/*3</i>	8	0.8%
43	<i>*1A/*1A</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*3/*3</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*3/*3</i>	2	0.2%
44	<i>*1A/*1A</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*3/*3</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*3/*3</i>	2	0.2%
45	<i>*1A/*1A</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*3/*3</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*3/*3</i>	1	0.1%
46	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	2	0.2%
47	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	14	1.4%
48	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*3/*3</i>	37	3.7%
49	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*1</i>	4	0.4%
50	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*3</i>	13	1.3%
51	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*3/*3</i>	27	2.7%
52	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*1/*1</i>	2	0.2%
53	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*1/*3</i>	8	0.8%
54	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*3/*3</i>	12	1.2%
55	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*2</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	2	0.2%
56	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*2</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	11	1.1%
57	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*2</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*3/*3</i>	29	2.9%
58	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*2</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*1</i>	6	0.6%
59	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*2</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*3</i>	18	1.8%
60	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*2</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*3/*3</i>	26	2.6%
61	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*2</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*1/*3</i>	10	1.0%
62	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*2</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*3/*3</i>	27	2.7%
63	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	4	0.4%
64	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	8	0.8%
65	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*3/*3</i>	9	0.9%
66	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*3</i>	7	0.7%
67	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*3/*3</i>	12	1.2%
68	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*1/*1</i>	1	0.1%
69	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*1/*3</i>	5	0.5%
70	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*3/*3</i>	3	0.3%
71	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*2/*2</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	2	0.2%
72	<i>*1A/*1C</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*2/*2</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*3/*3</i>	9	0.9%

73	*1A/*1C	*1/*1	*2/*2	*1/*10	*1/*1	2	0.2%
74	*1A/*1C	*1/*1	*2/*2	*1/*10	*1/*3	3	0.3%
75	*1A/*1C	*1/*1	*2/*2	*1/*10	*3/*3	6	0.6%
76	*1A/*1C	*1/*1	*2/*2	*10/*10	*1/*3	1	0.1%
77	*1A/*1C	*1/*1	*2/*2	*10/*10	*3/*3	3	0.3%
78	*1A/*1C	*1/*1	*2/*3	*1/*1	*1/*1	1	0.1%
79	*1A/*1C	*1/*1	*2/*3	*1/*1	*1/*3	5	0.5%
80	*1A/*1C	*1/*1	*2/*3	*1/*1	*3/*3	5	0.5%
81	*1A/*1C	*1/*1	*2/*3	*1/*10	*3/*3	3	0.3%
82	*1A/*1C	*1/*1	*2/*3	*10/*10	*1/*3	2	0.2%
83	*1A/*1C	*1/*1	*2/*3	*10/*10	*3/*3	3	0.3%
84	*1A/*1C	*1/*1	*3/*3	*1/*1	*1/*3	1	0.1%
85	*1A/*1C	*1/*1	*3/*3	*1/*1	*3/*3	1	0.1%
86	*1A/*1C	*1/*1	*3/*3	*1/*10	*3/*3	1	0.1%
87	*1A/*1C	*1/*1	*3/*3	*10/*10	*1/*1	2	0.2%
88	*1C/*1C	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*3	2	0.2%
89	*1C/*1C	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*3/*3	1	0.1%
90	*1C/*1C	*1/*1	*1/*1	*1/*10	*1/*3	4	0.4%
91	*1C/*1C	*1/*1	*1/*1	*1/*10	*3/*3	5	0.5%
92	*1C/*1C	*1/*1	*1/*1	*10/*10	*1/*3	3	0.3%
93	*1C/*1C	*1/*1	*1/*1	*10/*10	*3/*3	1	0.1%
94	*1C/*1C	*1/*1	*1/*2	*1/*1	*1/*1	2	0.2%
95	*1C/*1C	*1/*1	*1/*2	*1/*1	*1/*3	2	0.2%
96	*1C/*1C	*1/*1	*1/*2	*1/*10	*1/*3	1	0.1%
97	*1C/*1C	*1/*1	*1/*2	*1/*10	*3/*3	7	0.7%
98	*1C/*1C	*1/*1	*1/*2	*10/*10	*1/*3	1	0.1%
99	*1C/*1C	*1/*1	*1/*2	*10/*10	*3/*3	5	0.5%
100	*1C/*1C	*1/*1	*1/*3	*1/*1	*1/*3	1	0.1%
101	*1C/*1C	*1/*1	*1/*3	*1/*10	*3/*3	3	0.3%
102	*1C/*1C	*1/*1	*1/*3	*10/*10	*1/*3	1	0.1%
103	*1C/*1C	*1/*1	*1/*3	*10/*10	*3/*3	2	0.2%
104	*1C/*1C	*1/*1	*2/*2	*1/*1	*3/*3	2	0.2%
105	*1C/*1C	*1/*1	*2/*2	*1/*10	*3/*3	2	0.2%
106	*1C/*1C	*1/*1	*2/*3	*1/*1	*1/*3	2	0.2%
107	*1C/*1C	*1/*1	*2/*3	*1/*1	*3/*3	1	0.1%
108	*1C/*1C	*1/*1	*2/*3	*1/*10	*3/*3	1	0.1%
109	*1A/*1A	*1/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*3	3	0.3%
110	*1A/*1A	*1/*3	*1/*1	*1/*1	*3/*3	5	0.5%

111	<i>*IA/*IA</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*1</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*3</i>	2	0.2%
112	<i>*IA/*IA</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*1</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*3/*3</i>	2	0.2%
113	<i>*IA/*IA</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*1</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*3/*3</i>	3	0.3%
114	<i>*IA/*IA</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*2</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	2	0.2%
115	<i>*IA/*IA</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*2</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*3/*3</i>	2	0.2%
116	<i>*IA/*IA</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*2</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*3</i>	2	0.2%
117	<i>*IA/*IA</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*2</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*3/*3</i>	2	0.2%
118	<i>*IA/*IA</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*2</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*1/*3</i>	2	0.2%
119	<i>*IA/*IA</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*2</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*3/*3</i>	1	0.1%
120	<i>*IA/*IA</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	1	0.1%
121	<i>*IA/*IA</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*3/*3</i>	1	0.1%
122	<i>*IA/*IA</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*3</i>	2	0.2%
123	<i>*IA/*IA</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*3/*3</i>	2	0.2%
124	<i>*IA/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	1	0.1%
125	<i>*IA/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*3</i>	1	0.1%
126	<i>*IA/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*1</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*3/*3</i>	4	0.4%
127	<i>*IA/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*1</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*1</i>	1	0.1%
128	<i>*IA/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*1</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*3</i>	1	0.1%
129	<i>*IA/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*1</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*3/*3</i>	1	0.1%
130	<i>*IA/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*1</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*1/*3</i>	2	0.2%
131	<i>*IA/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*1</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*3/*3</i>	1	0.1%
132	<i>*IA/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*2</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*3</i>	2	0.2%
133	<i>*IA/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*2</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*3/*3</i>	1	0.1%
134	<i>*IA/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*2</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*3/*3</i>	1	0.1%
135	<i>*IA/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*1</i>	1	0.1%
136	<i>*IA/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*1/*3</i>	1	0.1%
137	<i>*IA/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*3/*3</i>	1	0.1%
138	<i>*IC/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*2</i>	<i>*1/*10</i>	<i>*3/*3</i>	2	0.2%
139	<i>*IC/*IC</i>	<i>*I/*3</i>	<i>*I/*2</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*3/*3</i>	1	0.1%
total						1003	100.0%

Table 9 Combined genotype frequency of *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* and *CYP3A5* in the Japanese population

Genotype							
No.	<i>CYP1A2</i>	<i>CYP2C9</i>	<i>CYP2C19</i>	<i>CYP2D6</i>	<i>CYP3A5</i>	Subject	%
1	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*3	33	3.3%
2	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*3/*3	44	4.4%
3	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*1/*10	*1/*3	23	2.3%
4	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*1/*10	*3/*3	25	2.5%
5	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*10/*10	*1/*3	17	1.7%
6	*1A/*1A	*1/*1	*1/*1	*10/*10	*3/*3	25	2.5%
7	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*1/*1	*1/*3	35	3.5%
8	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*1/*1	*3/*3	37	3.7%
9	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*1/*10	*1/*3	27	2.7%
10	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*1/*10	*3/*3	51	5.1%
11	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*10/*10	*1/*3	18	1.8%
12	*1A/*1A	*1/*1	*1/*2	*10/*10	*3/*3	30	3.0%
13	*1A/*1A	*1/*1	*1/*3	*1/*1	*3/*3	21	2.1%
14	*1A/*1A	*1/*1	*1/*3	*1/*10	*1/*3	11	1.1%
15	*1A/*1A	*1/*1	*1/*3	*1/*10	*3/*3	17	1.7%
16	*1A/*1A	*1/*1	*1/*3	*10/*10	*3/*3	10	1.0%
17	*1A/*1A	*1/*1	*2/*2	*1/*1	*3/*3	11	1.1%
18	*1A/*1A	*1/*1	*2/*2	*1/*10	*3/*3	11	1.1%
19	*1A/*1C	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*3	14	1.4%
20	*1A/*1C	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*3/*3	37	3.7%
21	*1A/*1C	*1/*1	*1/*1	*1/*10	*1/*3	13	1.3%
22	*1A/*1C	*1/*1	*1/*1	*1/*10	*3/*3	27	2.7%
23	*1A/*1C	*1/*1	*1/*1	*10/*10	*3/*3	12	1.2%
24	*1A/*1C	*1/*1	*1/*2	*1/*1	*1/*3	11	1.1%
25	*1A/*1C	*1/*1	*1/*2	*1/*1	*3/*3	29	2.9%
26	*1A/*1C	*1/*1	*1/*2	*1/*10	*1/*3	18	1.8%
27	*1A/*1C	*1/*1	*1/*2	*1/*10	*3/*3	26	2.6%
28	*1A/*1C	*1/*1	*1/*2	*10/*10	*1/*3	10	1.0%
29	*1A/*1C	*1/*1	*1/*2	*10/*10	*3/*3	27	2.7%
30	*1A/*1C	*1/*1	*1/*3	*1/*10	*3/*3	12	1.2%
total						682	68.0%

第3節 薬物代謝酵素 CYP2C9 及びビタミン K エポキシド還元酵素 VKORC1 の遺伝子多型に関する検討

第1項 目的

近年、血栓塞栓症の再発防止を目的として広く用いられている抗凝固薬ワルファリンにおける個体間変動は *CYP2C9**3 や *VKORC1* -1639G>A を含むいくつかの SNPs の関与が報告されている^{18,40,41)}。*VKORC1* はビタミン K エポキシド還元酵素複合体の構成要素であり、ビタミン K サイクルにおいて、血液凝固因子の活性化に必須な還元型ビタミン K を酸化型ビタミン K より再生する反応を触媒する酵素である⁴²⁾。しかしながら、ワルファリンは治療域が狭く、大きな個体間変動がある。特にワルファリン投与後に予測される副作用は、重篤かつ深刻な事態を招く可能性があるため、薬物投与前に個々の応答性が予測できることが望ましい。本節では抗凝固薬ワルファリンの標的酵素である代謝酵素遺伝子 *CYP2C9**3 および *VKORC1* -1639G>A の一塩基多型に第1節で開発した TaqMan PCR 法を適用した。さらに、PCR-RFLP 法を用いて、TaqMan PCR 法による遺伝子診断結果の正確性を検証した。これら2種類の遺伝子多型情報については、ワルファリン初期投与量予測に関する大規模な国際共同研究が行われ、臨床上的有用性が示されている⁴³⁾。さらに米国食品薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) は、*CYP2C9* と *VKORC1* 遺伝子多型に基づいたワルファリン予想初期投与量域を添付文書に記載させている。日本においてもワルファリンに関する薬物代謝酵素及び標的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、薬剤を投与する前にその患者の薬物体内動態を予測し、最適な薬剤投与量の調整が可能となると考えられる。これら

の多型については他の解析法での多くの報告があるが、本研究では我々の開発した乾燥唾液を用いた解析法で上記 2 つの遺伝子多型についてコンビネーション解析を行った⁴⁴⁾。

第 2 項 対象

本学学生に書面による説明を行い、同意が得られた本学学生 186 名を対象として乾燥唾液検体の提供を受け、薬物代謝酵素 *CYP2C9**3 及び *VKORC1* -1639G>A 遺伝子多型を行った。

第 3 項 実験方法

1. ダイレクト TaqMan PCR 法

乾燥唾液検体の 1.20 mm 径紙片を直接 TaqMan PCR 反応液に添加して、第 1 節で開発したダイレクト TaqMan PCR 法を用いて *CYP2C9**3 および *VKORC1* -1639G>A の SNP ジェノタイプングを行った。従って、乾燥唾液検体からの DNA 抽出に関する操作を全て省略した。

TaqMan 法を用いたリアルタイム PCR による遺伝子多型解析には、プライマーおよび TaqMan プローブは TaqMan SNP genotyping assays (Life Technologies 社) を用い (*CYP2C9**3 : C___27104892_10, *VKORC1* -1639G>A: C___1839943_10)、装置は ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems 社) を使用した。TaqMan SNP ジェノタイプング反応は、Thunderbird probe qPCR Mix 5.0 μL (東洋紡社)、2 × KOD FX buffer 1.0 μL (東洋紡社)、50×ROX reference dye (東洋紡社) 0.2 μL、20×TaqMan SNP genotyping assays (Life Technologies

社) 0.5 μ L、滅菌蒸留水 (DW) 3.3 μ L を加え、反応液全量を 10 μ L とした。Applied Biosystems 社の推奨する PCR サイクル条件を採用し、反応は 40 サイクル行った。

2. Duplex PCR-RFLP 法

前述の TaqMan PCR 法による遺伝子診断結果の正確性は、duplex PCR-RFLP 法を用いて検証した。乾燥唾液検体の 1.20 mm 径紙片を直接 duplex PCR 反応液に添加して *CYP2C9**3 および *VKORC1* -1639G>A の SNP ジェノタイピングを行った。遺伝子増幅は、*CYP2C9**3 および *VKORC1* -1639G>A の 2 種類の遺伝子を同時に行った。使用した PCR プライマーの配列を表に示す。反応液組成は、2 \times PCR Buffer for KOD FX 12.5 μ L (東洋紡社)、デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTPs) mixture (2 mM each) 2.5 μ L、*VKORC1*_F (20 μ M) 1.0 μ L、*VKORC1*_R (20 μ M) 1.0 μ L、*CYP2C9*_F (10 μ M) 1.0 μ L、*CYP2C9*_R (10 μ M) 1.0 μ L、KOD FX 0.5 μ L (東洋紡社)、滅菌蒸留水 (DW) 5.5 μ L を加え、反応液全量を 25 μ L にして、乾燥唾液検体の 1.20 mm 径紙片を直接反応液に添加した。PCR 反応条件は、予備加熱 95 $^{\circ}$ C 10 分の後、熱変性 98 $^{\circ}$ C 10 秒、アニーリング 64 $^{\circ}$ C 30 秒、伸長反応 74 $^{\circ}$ C 45 秒の 3 ステップのサイクルを 40 回繰り返し行い、最後に 72 $^{\circ}$ C 5 分間で伸長反応を完成させた後、16 $^{\circ}$ C に保った。サーマルサイクラーは Applied Biosystems Veriti (Applied Biosystems 社) を使用した。

次に、2 種類の遺伝子の増幅産物が混在した PCR 反応液を用いて、制限酵素処理反応を行った。PCR 反応液 (*VKORC1*: 718 bp, *CYP2C9*: 298 bp) 6 μ L に 10 \times NEB buffer-2 2 μ L、*MspI* 2 U (New England Biolabs)、*NsiI* 2 U (New England Biolabs)、蒸留水 11.6 μ L を加え全量 20 μ L

の反応液とした。制限酵素処理反応は 37℃で 2 時間反応した。制限酵素処理反応液 20 μL は MultiScreen®-HV (Merck Millipore 社) を使用して遠心濾過 (4℃, 1500 rpm, 2 分間) により精製した後、試薬キット DNA-1000 を使用し、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA MCE-202 (島津製作所社) を用いて制限酵素処理断片長を確認した。

第 4 項 結果及び考察

*CYP2C9*3* および *VKORC1 -1639G>A* のダイレクト TaqMan PCR の結果及び Duplex PCR 解析結果を Fig. 5、Fig. 6 に示した。また、健常日本人ボランティア 186 名の乾燥唾液検体を用いた *CYP2C9*3* および *VKORC1 -1639G>A* の SNP ジェノタイピング結果を Table 10 に示した。それぞれの遺伝子頻度は、既に報告されている日本人の分布とほぼ一致した⁴⁰⁾。
*CYP2C9*3* の判定では、野生型ホモ接合体 (*1/*1) が 180 名、ヘテロ接合体 (*1/*3) が 6 名検出され、変異型ホモ接合体 (*3/*3) は検出されなかった。一方、*VKORC1 -1639G>A* の判定では、野生型ホモ接合体 (G/G) が 1 名、ヘテロ接合体 (G/A) が 30 名、変異型ホモ接合体 (A/A) が 155 名検出した。これらの判定結果は、PCR-RFLP 多型診断法による検証実験結果と完全に一致した。このことから TaqMan PCR 法が高精度であることが実証できた。また、*CYP2C9*3* の遺伝子判定結果は第 2 節 Table 7 の 1,017 名の結果とも一致した。

薬物代謝酵素 *CYP2C9* の遺伝子多型については多数の変異型アレル (*CYP2C9*1* ~ *CYP2C9*30*) が報告されているが、その中で日本人固有の臨床的意義が明らかにされている変異は *CYP2C9*3* のみである⁴¹⁾。野生型ホモ接合体 (*1/*1)、ヘテロ型接合体 (*1/*3)、

変異型ホモ接合体 (*3/*3) での代謝活性が大きく違うことが報告されている⁴⁵⁾。すなわち、野生型ホモ接合体と比較してヘテロ型接合体では抗凝固活性型 S-ワルファリンの代謝活性が 50%以下となり、変異型ホモ接合体では 90%程度低下する。本報では、ヘテロ型接合体 (*1/*3) の頻度は約 3% (6 名/186 名) であり、変異型ホモ接合体は観察されなかった。ヘテロ型接合体 (*1/*3) の患者は、S-ワルファリンの代謝活性が 50%以下に低下するため、ワルファリン初期導入期に通常量を投与すると血液のプロトロンビン時間 (PT-INR) の上限を超えるリスクが高く、出血頻度が高くなる可能性がある。また、S-ワルファリンの肝代謝活性が小さいためワルファリン中止後、体内から消失する半減期も野生型ホモ接合体 (*1/*1) の患者の 2 倍以上長くなる。すなわち、休薬後の作用持続時間が長いため、投与中止時期にも臨床的配慮が必要となる。従って、脳卒中等の血栓塞栓症の治療にワルファリンを処方して治療を行う場合、ヘテロ型接合体 (*1/*3) の患者は副作用リスクの非常に高い集団であると言える。

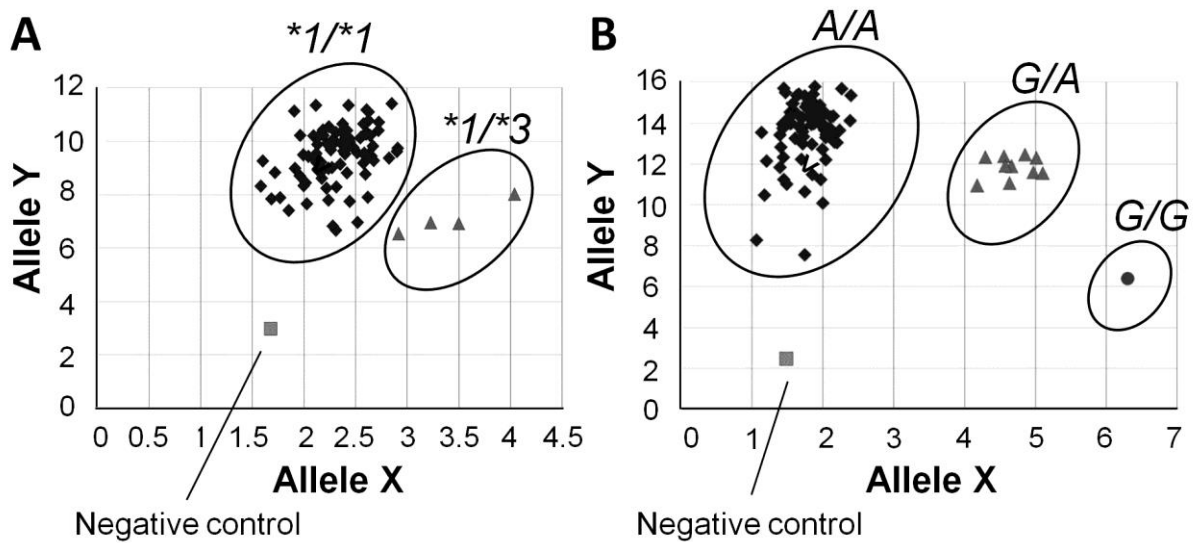


Fig. 5 Result of TaqMan PCR for *CYP2C9* and *VKORC1*.

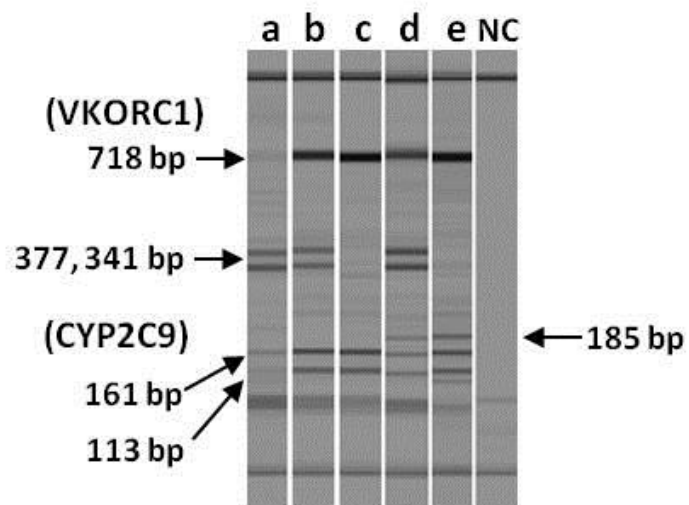


Fig. 6 Result of PCR-RFLP for *CYP2C9* and *VKORC1*. Lane a: *CYP2C9**1/*1 (161, 113 bp), *VKORC1* G/G (377, 341 bp). Lane b: *CYP2C9**1/*1 (161, 131 bp), *VKORC1* G/A (718, 377 and 341 bp). Lane c: *CYP2C9**1/*1 (161, 113 bp), *VKORC1* A/A (718 bp). Lane d: *CYP2C9**1/*3 (185, 161 and 113 bp), *VKORC1* G/A (718, 377 and 341 bp). Lane e: *CYP2C9**1/*3 (185, 161 and 113 bp), *VKORC1* A/A (718 bp).

Table 10 Genotype frequencies of *CYP2C9* and *VKORC1* (%)

Genotype		n	This study (n=186)	Reference ³⁹⁾ (n=341)
<i>CYP2C9</i>	<i>*1/*1</i>	180	96.8	95.9
	<i>*1/*3</i>	6	3.2	4.1
	<i>*3/*3</i>	0	0.0	0.0
<i>VKORC1</i>	<i>G/G</i>	1	0.5	0.3
	<i>G/A</i>	30	16.1	15.8
	<i>A/A</i>	155	83.3	83.9

Table 11 には、本研究で見られた遺伝子多型頻度及び米国のワルファリン添付文書に収載された遺伝子型別の予想初期投与量域を併せて記載した。以上の結果から、血栓症を罹患する前に薬物代謝酵素 *CYP2C9* の遺伝子多型情報を事前に得ておくことができれば、野生型ホモ接合体 (**1/*1*) の患者 (93%) は、ワルファリン投与量を 3~7 mg の中央値 5 mg を選択し、さらに年齢及び身体情報を考慮した用量で薬物療法を即座に開始した後、血液のプロトロンビン時間 (PT-INR) により微調整を行うことが可能になる。ヘテロ型接合体 (**1/*3*) および変異型ホモ接合体 (**3/*3*) の患者は、*VKORC1 -1639G>A* 遺伝子多型診断結果および臨床検査値等を考慮した投与設計を行うことで、重篤な副作用を避けてより適正な抗凝固療法を行うことが可能となる。特に *CYP2C9*1/*3* かつ *VKORC1A/A* の患者は、予想初期投与量が 0.5~2 mg と明らかに低いため (Table 11)、薬を投与する前に遺伝子多型診断を行い、遺伝子型を考慮した投与設計を行うことで、至適投与量の決定までの時間を短縮できるため、より有効で安全な抗凝固療法を行うことが可能になる。

Table 11 Combined genotype of *CYP2C9* and *VKORC1* genes in our study and initial dose based on genetic information in warfarin package insert

<i>VKORC1</i> genotype	<i>CYP2C9</i> genotype					
	<i>*1/*1</i>		<i>*1/*3</i>		<i>*3/*3</i>	
	n	Doses ^{a)}	n	Doses ^{a)}	N	Doses ^{a)}
<i>G/G</i>	1	5-7 mg	0	3-4 mg	0	0.5-2 mg
<i>G/A</i>	28	5-7 mg	2	3-4 mg	0	0.5-2 mg
<i>A/A</i>	151	3-4 mg	4	0.5-2 mg	0	0.5-2 mg

a) Expected Initial dose range of genotyping of warfarin package insert listing of the United States

第4節 小括

乾燥唾液検体の水溶紙片を直接 TaqMan PCR 反応液に添加してリアルタイム PCR 法で遺伝子多型を判定する SNP ジェノタイピングの開発を行い、PCR-RFLP 法の結果と完全に一致したことから、その正確性は保証された。我々の開発した遺伝子解析法は、生体試料から DNA 抽出を行わず TaqMan SNP ジェノタイピングを実施可能であることから、DNA 抽出操作に関わる全ての費用および時間を削減でき、非常に安価な信頼性の高い新規な遺伝子診断法であることが実証された。また、本解析法を用いた主要薬物代謝酵素遺伝子の体系的な解析結果により、日本人 1,003 名の遺伝子型は非常に多様性に富むことが示唆された。

第2章 CYP2D6*5 遺伝子多型に関する検討

第1節 プライマー設計及び反応条件の検討

第1項 目的

CYP2D6 は、臨床で使用されている薬剤の 20～25%の代謝に関わっており⁴⁶⁻⁴⁸⁾、CYP3A4 に次いで多くの薬物を基質とする重要な薬物代謝酵素である。CYP2D6 の近傍には CYP2D7P 及び CYP2D8P の偽遺伝子が存在し、CYP2D6 と非常に高い相同性を示している。CYP2D6 遺伝子多型はこれまでに多く報告されており、多型の頻度には人種差が認められている⁴⁹⁾。そのため人種ごとに考慮すべき多型が異なる。中でも以前は CYP2D6*10 が重要とされていたが、CYP2D6*5 も重要であることがわかってきた。CYP2D6*5 は、代謝能が欠損 (poor metabolizer: PM) する重要な遺伝子多型であり、そのアレル頻度は日本人において約 6%である⁵⁰⁾。ところが、CYP2D6*5 は CYP2D6 遺伝子が完全に欠落しているため検出が非常に難しい。一般には、血液サンプルから DNA を抽出・精製して、非常に遺伝子増幅効率の低い long-PCR 法による CYP2D6*5 の判定が行われている^{51, 52)}。血液を使用すれば、既に報告のある方法で解析できるが、侵襲性、廃棄などの問題がある。唾液を使用することは、被験者の負担を考えると有益であり、第1章で述べた TaqMan PCR 法と同じ検体を使用できれば、CYP2D6*5 もコンビネーションに含めることができる。既法の方法を用いて解析を実施したが、唾液検体では一回の Long PCR で増幅を確認することが困難であった。そこで、特異性を上げるために Nested long PCR を検討した。新しく primer を設計するにあたり CYP2D6 遺伝子の両サイドに存在する多くの繰り返し配列を回避した。非侵襲的サンプリン

グ法の乾燥濾紙唾液を直接 PCR 反応液に添加する Nested long PCR 法を検討し、次節において臨床で応用可能な薬物代謝酵素 *CYP2D6**5 の遺伝子診断法の開発につなげた³⁷⁾。

第 2 項 実験方法

1. *CYP2D6* 遺伝子付近の配列検索

UCSC Genome Browser を用いて、*CYP2D6* 遺伝子の両サイドの配列の検索を行った。また、primer 設計を行うにあたり、遺伝子付近に見られる繰り返し配列を避けるために、*CYP2D6* 遺伝子前後の配列を BLAST にて相同検索を行い、*CYP2D6* 遺伝子配列を含めた遺伝子地図を作製した。*CYP2D6* 遺伝子地図を作製したところ、*CYP2D6* 遺伝子の両サイドに 3 つの相同配列 (α : 72 bp、 β : 184 bp、 γ : 2526 bp) が存在した (Fig. 7)。

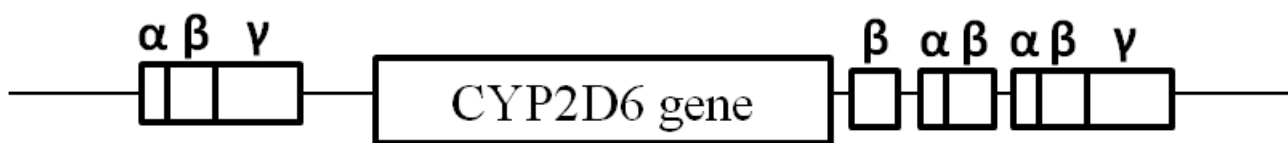


Fig. 7 Scheme of repetitive sequences around *CYP2D6* gene.

2.シーケンス反応

作成した遺伝子地図より遺伝子欠損部位の探索を行うために、シーケンスを行った。

<ゲル精製>

CYP2D6*5 をもつ検体の DNA 増幅産物を 1.5%アガロースゲル、TBE buffer を用いて電気泳動を行い、ゲルの切り出し精製を行った。精製には Takara SUPREC[®]-MZ kit を使用した。

切り出したゲルを 1.5mL チューブに入れ、50℃、5 分で保った。さらに Gel Nebulizer に入れ、5000×g、4℃、10 分で遠心分離後、溶出したろ液を用いてエタノール沈殿を行った。

<シーケンス反応>

シーケンス反応は、Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit version 1.1 (Applied Biosystems 社) を用いた。ゲル精製後のサンプルを用いて、Big Dye Ver 1.1 4μL、5×Sequence Buffer 2 μL、each primer (3μM) 1 μL、template 1 μL、DW 12 μL で反応液全量を 20 μL とした。PCR 反応条件は、予備加熱 96℃ 1 分、その後熱変性 96℃ 10 秒、アニーリング 50℃ 5 秒、伸長反応 60℃ 4 分の 3 ステップのサイクルを 25 回繰り返し行い、16℃に保った。Cycle sequence 反応後、過剰な Dye Terminator を除去するためにエタノール沈殿を行い、真空乾燥機で乾燥させた後、Loading Buffer 15μL 加えた。その後溶解した DNA サンプルを熱変性のために、95℃で 5 分間加熱し、すぐに氷上で冷却した。塩基配列の決定は、自動シーケンサー Genetic Analyzer ABI PRISM-310 (Applied Biosystems 社) を用いて行った。配列データは

DNA Sequencing Software を用いて確認した。

3. Nested long PCR 法

Nested long PCR ジェノタイピング反応は、first-round long PCR 反応と、プライマーを少し内側に設計し特異性を向上させて検出する Nested long PCR 反応から構成される。First-round PCR primer、Nested PCR primer の primer 設計には UCSC Genome Browser、primer 3 を用いた。PCR 反応は、既報の反応条件では唾液検体での増幅が確認できなかったため、Long PCR に推奨されるステップダウン PCR 反応条件をアレンジし、検討を行った (TOYOBO Technical Review)。

<ステップダウン PCR 条件>

94°C	5min		
98°C	10sec	←	5 cycles
74°C	10min	└─	
98°C	10sec	←	
72°C	10min	└─	5 cycles
98°C	10sec	←	
70°C	10min	└─	5 cycles
98°C	10sec	←	
68°C	10min	└─	20 cycles
98°C	10sec	←	
65°C	30sec	└─	
68°C	10min	└─	
68°C	10min		
16°C	∞		

プライマー設計は *CYP2D6* 遺伝子配列解析を行い、Fig. 7 に示す *CYP2D6* 遺伝子の両サイドに存在する 3 つの相同配列を回避して設計を試みた。first-round long PCR 用のプライマーは特異性を上げるために、報告のある既存のプライマーにそれぞれ 3' 側に 5~10 bp を加えた^{52,53)}。さらに Nested long PCR primer は first-round PCR primer よりそれぞれ 500 bp、500 bp、150 bp 内側に設計した (Table 12)。

Table 12 Primers used in the current investigation

	Primer name	Sequence
i	CYP2D6_1	5'-GCCGACTGAGCCCTGGGAGGTAGGTAGCCCTG-3'
ii	CYP2D6_2	5'-GTTATCCCAGAAGGCTTTGCAGGCTTCAGGAGC-3'
iii	CYP2D6_3	5'-GCATGAGCTAAGGCACCCAGACTATATTTTGTC-3'
iv	CYP2D6_4	5'-ACCGGGCACCTGTACTCCTCAGCCCTTG-3'
v	CYP2D6_5	5'-TGGCTAGGGAGCAGGCTGGGGACTAGGTAC-3'
vi	CYP2D6_6	5'-CTTCCAGAACACACCATACTGCTTCGACCAGGTGAG-3'
vii	CYP2D6_7	5'-GACTGAGGCCTGGCGACAATTCAAGTGTGGTG-3'

< first-round long PCR >

乾燥唾液検体の 2 mm 径ろ紙片を直接 PCR 反応液に添加して *CYP2D6**5 の first-round long PCR 法で行った。PCR 装置は Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems 社) を使用した。first-round PCR 反応液組成は、2 ×PCR Buffer for KOD FX Neo (KFX-201、東洋紡社) 12.5 μL、2 mM dNTPs 3.25 μL (KFX-201、東洋紡社)、15 pmol each of CYP2D6_3 and CYP2D6_4 primers、30 pmol each of CYP2D6_1 and CYP2D6_2 primers、KOD FX Neo DNA polymerase (1 U/μL、KFX-201、東洋紡社) 0.5 μL、滅菌蒸留水 5 μL を加え、反応液全量を 25 μL とした。遺伝子

増幅反応条件は東洋紡社推奨のステップダウン Long PCR サイクル条件をアレンジした条件を採用した。

< Nested long PCR 反応 >

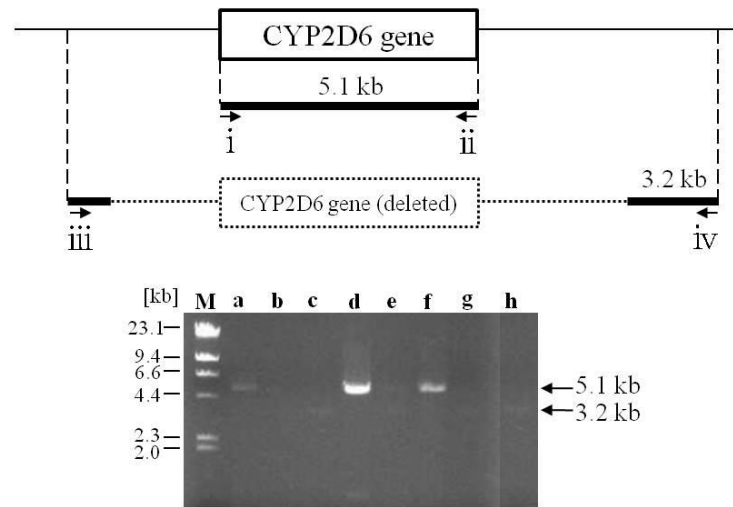
Nested long PCR 反応液組成は、first-round PCR 反応液を 10 倍希釈したサンプル 1 μ L、2 \times PCR Buffer for KOD FX Neo 12.5 μ L、2 mM dNTPs 3.25 μ L、15 pmol each of CYP2D6_3 and CYP2D6_7 primers、30 pmol each of CYP2D6_5 and CYP2D6_6 primers、KOD FX Neo DNA polymerase 0.5 μ L、滅菌蒸留水 3.25 μ L を加え、反応液全量を 25 μ L とした。反応条件は、first-round long PCR 反応と同様条件で行った。Nested long PCR により得られた PCR 産物を 1.0%アガロースゲルで電気泳動して判定を行った。

第 3 項 結果および考察

シーケンス解析の結果、*CYP2D6**5 をもつ 2 検体で *CYP2D6* 遺伝子が欠損を示す配列をもつ結果を得た。これらの結果より、Nested long PCR 法での primer を設計し、Nested long PCR 反応条件の検討を行い、Nested long PCR により得られた産物を 1%アガロースゲルで電気泳動を行った結果を Fig. 8 に示した。DNA の増幅は唾液サンプルの DNA 量やサンプル採取日に依存し、first-round long PCR 後は明確な増幅産物が確認できず、遺伝子多型の判別が困難なサンプルもあった (Fig. 8A)。一方で Nested long PCR 後はほぼ全てのサンプルで DNA の

増幅を確認できた (Fig. 8B)。野生型ホモ接合体で目的とする 4.1 kb のバンドが現れ、ヘテロ接合体では 4.1 kb と 3.1 kb の 2 本の増幅産物が視認でき、変異型ホモ接合体は 3.1 kb の増幅産物のみが観察された。内側の 5.1 kb、4.1 kb は *CYP2D6* 遺伝子の検出、外側の 3.2 kb、3.1 kb は遺伝子の欠損を検出する。また、いくつかの検体において目的の増幅産物以外のものが増幅されていると考えられる結果を得たが、Nested long PCR を行う際に first-round long PCR 産物の添加量を減らすことで、目的のバンドの検出精度が上がった。*CYP2D6*5* は遺伝子そのものの欠損をみており、遺伝子全長 5.1 kb の増幅に十数時間を要するため、primer の検討を含めたさらに簡便な方法が望まれる。

(A) first-round long PCR



(B) Nested long PCR

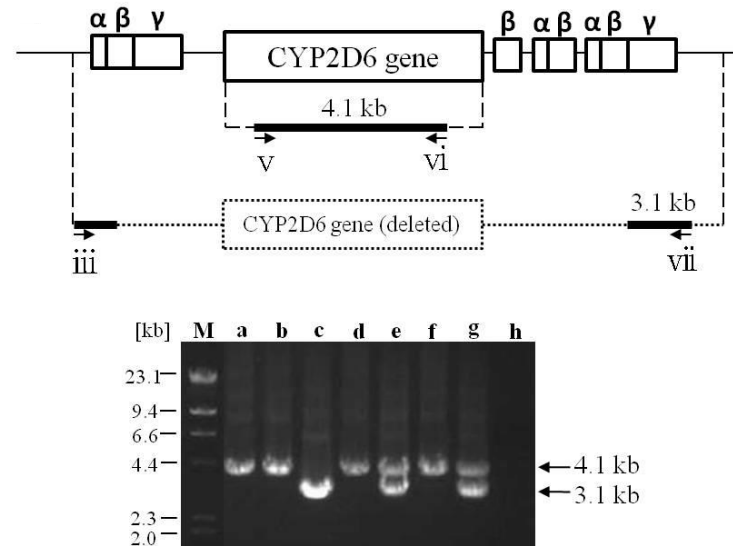


Fig. 8 Scheme of long PCR analyses for *CYP2D65.**

(A) The first-round long PCR was formed by four primers, i - iv, as indicated in the upper panel. Dotted line indicated deletion of *CYP2D6**5. Samples were electrophoresed in 1 % agarose gels in 0.5 x Tris-acetate-EDTA buffer. Two bands, 5.1 kb and 3.2 kb in the gel, were amplified as the result of the first-round long PCR. (B) The nested long PCR was formed by four primers, iii, v - vii. There are intricate repetitive sequences around *CYP2D6* gene which indicated α , β and γ . Two bands of 4.1 kb and 3.1 kb products were amplified. The detection of *CYP2D6**5 is, as follows, Lane a, b, d and f: *1/*1, Lane c: *5/*5, Lane e and g: *1/*5, Lane h: negative control. M is the size standard marker of λ -Hind III digest.

第2節 日本人における *CYP2D6**5 遺伝子多型頻度

第1項 目的

*CYP2D6**5 は、日本人のアレル頻度は約 6%であり、PM を示す重要な遺伝子多型である。

本節では、第1節で開発した Nested long PCR 法を用いて遺伝子頻度解析を行った。

第2項 対象

書面による説明を行い同意が得られた本学学生 78 名を対象として生体試料 (唾液) の提供を受け、薬物代謝酵素 *CYP2D6**5 遺伝子多型診断を実施した。なお、本研究は ヒトゲノム遺伝子解析研究の倫理指針に準拠した武庫川女子大学倫理委員会において承認されている。

第3項 実験方法

第2章第1節で開発した Nested long PCR 法を用いて遺伝子頻度解析を行った。

第4項 結果および考察

健常日本人ボランティア 78 名の乾燥唾液検体を用いて *CYP2D6**5 遺伝子ジェノタイピングを実施した結果、ヘテロ接合体が 10 名検出され、変異型ホモ接合体は検出されなかった。これらの判定結果は既報の 162 名の多型頻度とほぼ一致した (Table 13)。また、本解析結果は第1章第2節で考察した *CYP2D6**10 について、いくつかのサンプルで解析不可でありこのサンプルが *CYP2D6**5 をもつ可能性があると考えたが、*CYP2D6**10 解析において解析

不可であったサンプル、解析結果がホモ (*1/*1・*10/*10) であったサンプルは、*CYP2D6* 遺伝子が2本もしくは1本欠損している可能性がある。第1章第2節で考察した *CYP2D6**10 と一部のサンプルは同じサンプルを用いたが、*CYP2D6**10 と *CYP2D6**5 の解析結果に矛盾はなかった。解析精度の検証実験は、欠損している塩基配列が非常に長いため、検証方法を含め今後の課題である。

Table 13 Genotype distribution of *CYP2D65 in the 78 healthy Japanese volunteers (%)**

Genotype	This study	Reference ⁵⁰⁾
*1/*1	87.2	87.7
*1/*5	12.8	12.3
*5/*5	0	0
Allele frequency	This study	Reference ⁵⁰⁾
*1	93.6	93.8
*5	6.4	6.2

第3節 小括

唾液検体を用いて、増幅の困難な *CYP2D6**5 の Nested long PCR 法での検出に成功した。日本人における *CYP2D6* の PM の頻度は少なく、白人種に比べて報告数が少ないため、さらなる研究が必要であると考えられる。今後、解析精度の検証実験を含めた、臨床応用可能な簡便で高精度な解析法の検討を行っていく予定である。

総括

遺伝子解析研究が進むにつれ遺伝子検査は今後も普及していくと考えられる。臨床現場では非侵襲で容易に得られる非血液検体（唾液など）に適用可能な迅速・簡易・安価で信頼性の高い遺伝子多型診断システムを確立しておくことは非常に有用である。水溶紙に採取した乾燥唾液検体は、室温で非常に安定なため通常郵便にて郵送も可能であり、また、室温で長期保存も可能である。第1章では、乾燥唾液検体を用いた簡便なダイレクト TaqMan PCR 法の開発を行い、この解析手法を用いて日本人 1,017 名の薬物代謝酵素遺伝子 *CYP1A2*、*CYP2C9*、*CYP2C19*、*CYP2D6*、*CYP3A5* のポピュレーション解析を実施した。これらの結果は、日本人 1,000 名以上の集団における *CYP1A2*、*CYP2C9*、*CYP2C19*、*CYP2D6*、*CYP3A5* 遺伝子についてコンビネーション解析を実施した最初の報告である。また米国で臨床応用されているワーファリンの代謝関連酵素遺伝子についても解析可能であった。このことから、本研究で開発した解析法は、容易に採取可能な唾液を使用した迅速・簡易・安価で信頼性の高い遺伝子解析法であることが確認できた。

第2章では遺伝子欠損を伴う *CYP2D6**5 多型解析実験法の確立を行い、乾燥唾液検体を用いて Nested long PCR 法により遺伝子解析が可能であることを示すことができた。特に *CYP2D6* は臨床で使用されている多くの薬剤の代謝に関わるため、PM を示す *CYP2D6**5 は薬物治療を行う上で重要である。今後さらなる遺伝子解析法の改良を行い、より簡便で信頼性の高い解析法の検討を行っていく予定である。

本研究で報告した薬物代謝関連遺伝子 *CYP1A2*、*CYP2C9*、*CYP2C19*、*CYP2D6*、*CYP3A5* 及び *VKORC1* 遺伝子多型に関する新規遺伝子解析法を臨床応用するには、薬剤師の治療への介入が必要不可欠である。第 1 章で開発した水溶紙と唾液を用いたサンプリングは薬剤師にも取り扱い可能であり、薬剤師が薬物動態を把握し投与設計に効果的に介入することで、質の高い医療の提供ができると期待される。数多く報告されている遺伝子情報の中から、臨床において有用なものを取捨選択し、正確な遺伝子診断法を確立することは、質の高い医療の一步であると考え。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、薬剤を投与する前にその患者の薬物体内動態を予測し、予期できる重篤な副作用を防ぐとともに、最適な薬物の選択や投与量の調節が可能となると考える。今後これらのゲノム情報を応用することで、より適正な薬物治療が実現していくことを期待するとともに、本新規遺伝子解析法が個別化医療の発展に貢献することを切に願う。

謝辞

本研究を進め、本論文をまとめるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました武庫川女子大学薬学部、木下健司教授、村田成範准教授に深く感謝致します。

本論文の作成にあたり、御懇切なる御指導、御助言を賜りました武庫川女子大学薬学部、衛生化学研究室 西川淳一教授、臨床薬学研究室 岡村昇教授に深く感謝致します。

また、本研究遂行にあたり、数々の有益な御助言、御支援を賜りました、武庫川女子大学薬学部 ゲノム機能解析学研究室 増見恭子助手、鎌田由佳助手、林田真梨子研究生に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究に御協力くださいました、武庫川女子大学薬学部、ゲノム機能解析学研究室の院生、学生、卒業生の皆様に深く感謝致します。

最後に、本研究を遂行するにあたり常に激励していただいた家族に心から感謝致します。

論文目録

本研究の一部は以下の論文に公表した。

Tomoko Ota, Mariko Hayashida, Minoru Ishii, Kyoko Iwao-Koizumi, Shigenori Murata, Kenji Kinoshita, Long PCR-based genotyping for deleted *CYP2D6* gene without DNA extraction, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **29**, 283-285 (2014).

Tomoko Ota, Mariko Hayashida, Kyoko Iwao-Koizumi, Shigenori Murata, Kenji Kinoshita, High Performance and Straightforward Genotyping of the Cytochrome P450 2C9 (*CYP2C9*) and Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1 (*VKORC1*) Polymorphisms, *Japanese Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, **40**, 402-408 (2014).

参考文献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004, **431**: 931-945.
- 2) Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Altman RB, Klein TE. Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2012, **92**: 414-417.
- 3) Iyer L, Ratain MJ. Pharmacogenetics and cancer chemotherapy. *Eur J Cancer*. 1998, **34**: 1493-1499.
- 4) Magnus Ingelman-Sundberg. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci*. 2004, **25**: 193-200.
- 5) Sim SC, Ingelman-Sundberg M. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum Genomics*. 2010, **4**: 278-281.
- 6) Hayashida M, Iwao-Koizumi K, Murata S, Yokoyama A, Kinoshita K. Genotyping of Polymorphisms in Alcohol and Aldehyde Dehydrogenase Genes by Direct Application of PCR-RFLP on Dried Blood without DNA Extraction. *Anal Sci*. 2010, **26**: 503-505.
- 7) Hayashida M, Iwao-Koizumi K, Murata S, Yokoyama A, Kinoshita K. Single-Tube Genotyping from a Human Hair Root by Direct PCR. *Anal Sci*. 2009, **25**: 1487-1489.
- 8) Borgiani P, Ciccacci C, Forte V, Sirianni E, Novelli L, Bramanti P, Novelli G. CYP4F2 genetic variant (rs2108622) significantly contributes to warfarin dosing variability in the Italian population. *Pharmacogenomics*. 2009, **10**: 261-266.
- 9) 盛岡弘康, 萩野明人, 松森泰明. 水溶性感熱紙の開発. 紙パ技協誌. 2011, **65**: 360-363.

- 10) Hayashida M, Ota T, Ishii M, Iwao-Koizumi K, Murata S, Kinoshita K. Direct Detection of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) by the TaqMan PCR assay using Dried Saliva on Water-soluble Paper and Hair-roots, without DNA Extraction. *Anal Sci.* 2014, **30**: 427-429.
- 11) Rochat B. Role of Cytochrome P450 Activity in the Fate of Anticancer Agents and in Drug Resistance Focus on Tamoxifen, Paclitaxel and Imatinib Metabolism. *Clin Pharmacokinet.* 2005, **44** : 349-366.
- 12) van der Weide J, Hinrichs JW. The Influence of Cytochrome P450 Pharmacogenetics on Disposition of Common Antidepressant and Antipsychotic Medications. *Clin Biochem Rev.* 2006, **27**: 17-25.
- 13) Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet.* 2002, **360**: 1155-1162.
- 14) Tomalik-Scharte D, Maiter D, Kirchheiner J, Ivison HE, Fuhr U, Arlt W. Impaired hepatic drug and steroid metabolism in congenital adrenal hyperplasia due to P450 oxidoreductase deficiency. *Eur J Endocrinol.* 2010, **163**: 919-924.
- 15) Zhou S-F, Yang L-P, Zhou Z-W, Liu Y-H, Chan E. Insights into the Substrate Specificity, Inhibitors, Regulation, and Polymorphisms and the Clinical Impact of Human Cytochrome P450 1A2. *The AAPS Journal.* 2009, **11**: 481-494.
- 16) Backman JT, Karjalainen MJ, Neuvonen M, Laitila J, Neuvonen PJ. Rofecoxib is a potent inhibitor of cytochrome P450 1A2: studies with tizanidine and caffeine in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2006, **62**: 345-357.
- 17) Yin T, Maekawa K, Kamide K, Saito Y, Hanada H, Miyashita K, et al. Genetic Variations of *CYP2C9* in 724 Japanese Individuals and Their Impact on the Antihypertensive Effects of Losartan. *Hypertens Res.* 2008, **31**: 1549-1577.
- 18) Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics.* 2002, **12**: 251-263.

- 19) Furuta T, Shirai N, Sugimoto M, Nakamura A, Hishida A, Ishizaki T. Influence of *CYP2C19* Pharmacogenetic Polymorphism on Proton Pump Inhibitor-based Therapies. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2005, **20**: 153-167.
- 20) Thorn CF, Whirl-Carrillo M, Leeder JS, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: phenytoin pathway. *Pharmacogenet Genomics.* 2012, **22**: 466-470.
- 21) Lee SJ. Clinical application of *CYP2C19* pharmacogenetics toward more personalized medicine. *Front Genet.* 2013, **3**: 318.
- 22) Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK, Tanigawara Y, Hosono N, Kubo M, et al. Dose-adjustment study of tamoxifen based on *CYP2D6* genotypes in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2012, **131**: 137-145.
- 23) Crews KR, Gaedigk A, Dunnenberger HM, Klein TE, Shen DD, Callaghan JT, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for Codeine Therapy in the Context of Cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*) Genotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2012, **91**: 321-326.
- 24) Kiyotani K, Shimizu M, Kumai T, Kamataki T, Kobayashi S, Yamazaki H. Limited effects of frequent *CYP2D6**36-*10 tandem duplication allele on in vivo dextromethorphan metabolism in a Japanese population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2010, **66**: 1065-1068.
- 25) Katsakiori PF, Papapetrou EP, Goumenos DS, Nikiforidis GC, Flordellis CS. Tacrolimus and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors: An interaction study in *CYP3A5* non-expressors, renal transplant recipients. *Indian J Pharmacol.* 2011, **43**: 385-388.
- 26) Miao J, Jin Y, Marunde RL, Kim S, Quinney S, Radovich M, et al. Association of Genotypes of the *CYP3A* Cluster with Midazolam Disposition *In Vivo*. *Pharmacogenomics J.* 2009, **9**: 319-326.
- 27) Arvanitidis K, Ragia G, Iordanidou M, Kyriaki S, Xanthi A, Tavridou A, et al. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* and *CYP3A5* in

the Greek population. *Fund Clin Pharmacol*. 2007, **21**: 419-426.

- 28) Wu Z, Zhang X, Shen L, Xiong Y, Wu X, Huo R, et al. A Systematically Combined Genotype and Functional Combination Analysis of *CYP2E1*, *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* in Different Geographic Areas of Mainland China – A Basis for Personalized Therapy. *PLoS One*. 2013, **8**.
- 29) Ota T, Kamada Y, Hayashida M, Iwao-Koizumi K, Murata S, Kinoshita K. Combination Analysis in Genetic Polymorphisms of Drug-Metabolizing Enzymes *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* and *CYP3A5* in the Japanese Population. *Int J Med Sci*. in press.
- 30) Grasma"der K, Verwohlt PL, Ku"hn KU, Dragicevic A, von Widdern O, Zobel A, et al. Population pharmacokinetic analysis of mirtazapine. *Eur J Clin Pharmacol*. 2004, **60**: 173-480.
- 31) Wolf CR, Smith G, Smith RL. Science, medicine, and the future Pharmacogenetics. *BMJ*. 2000, **320**: 987-990.
- 32) Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, Fava G, Spina E. Allele and genotype frequencies of *CYP2C9*, *CYP2C19* and *CYP2D6* in an Italian population. *Pharmacol Res*. 2004, **50**: 195-200.
- 33) Chida M, Yokoi T, Fukui T, Kinoshita M, Yokota J, Kamataki T. Detection of three genetic polymorphisms in the 5'-flanking region and ontron 1 of human *CYP1A2* in the Japanese population. *Jpn J Cancer Res*. 1999, **90**: 899-902.
- 34) Zand N, Tajik N, Hoormand M, Monghaddam AS, Milanian I. Allele frequency of *CYP2C19* gene polymer phisms in a healthy Iranian population. *Indian J Med Res*. 2005, **4**: 124-127.
- 35) Wang SL, Huang Jd, Lai MD, Liu BH, Lai ML. Molecular basis of genetic variation in debrisoquin hydroxylation in Chinese subjects: Polymorphism in RFLP and DNA sequence of *CYP2D6*. *Clin Pharmacol Ther*. 1993, **53**: 410-418.
- 36) Myrand SP, Sekiguchi K, Man MZ, Lin X, Tzeng R-Y, Teng C-H, et al. Pharmacokinetics/Genotype Associations for Major Cytochrome P450 Enzymes in Native and First- and Third-generation Japanese Populations: Comparison With Korean, Chinese, and Caucasian Populations. *Clini Pharmacol Ther*. 2008, **84**: 347-361.

- 37) Ota T, Hayashida M, Ishii M, Iwao-Koizumi K, Murata S, Kinoshita K. Long PCR-based genotyping for deleted *CYP2D6* gene without DNA extraction. *Drug Metab Pharmacokine*. 2014, **29**: 283-285.
- 38) Makeeva O, Stepanov V, Puzyrev V, Goldstein DB, Grossman I. Global pharmacogenetics: genetic substructure of Eurasian populations and its effect on variants of drug-metabolizing enzymes. *Pharmacogenomics*. 2008, **9**: 847-868.
- 39) Gervasini G, Benítez J, Carrillo JA. Pharmacogenetic testing and therapeutic drug monitoring are complementary tools for optimal individualization of drug therapy. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010, **66**: 755-774.
- 40) Yoshizawa M, Hayashi H, Tashiro Y, Sakawa S, Moriwaki H, Akimoto T, et al. Effect of *VKORC1* -1639 G>A polymorphism, body weight, age, and serum albumin alterations on warfarin response in Japanese patients. *Thromb Res*. 2009, **124**: 161-166.
- 41) Ohno M, Yamamoto A, Ono A, Miura G, Funamoto M, Takemoto Y, et al. Influence of clinical and genetic factors on warfarin dose requirements among Japanese patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009, **65**: 1097-1103.
- 42) 有吉範高, 中澤一純, 北田光一. ワルファリン治療個別化に利用可能な簡易・同時遺伝子診断法の確立. 医療薬学. 2009, **35**: 551-557.
- 43) The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. *N Engl J Med*. 2009, **360**: 753-764.
- 44) Ota T, Hayashida M, Iwao-Koizumi K, Murata S, Kinoshita K. High Performance and Straightforward Genotyping of the Cytochrome P450 2C9 (*CYP2C9*) and Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1 (*VKORC1*) Polymorphisms. *Jpn J Pharm Health Care Sci*. 2014, **40**: 402-408.

- 45) Takahashi H, Kashima T, Nomizo Y, Muramoto N, Shimizu T, Nasu K, et al. Metabolism of warfarin enantiomers in Japanese patients with heart disease having different *CYP2C9* and *CYP2C19* genotypes. *Clin Pharmacol Ther.* 1998, **63**: 519-528.
- 46) Teh KL, Bertilsson L. Pharmacogenomics of CYP2D6: Molecular genetics, Interethnic differences and clinical importance. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012, **27**: 55-67.
- 47) Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* 2005, **5**: 6-13.
- 48) Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2004, **369**: 23-37.
- 49) Kubota T, Chiba K, Iga T. Frequency Distribution of CYP2C19, CYP2D6, and CYP2C9 Mutate-alleles in Several Different Populations. *Xenobio Metabol and Dispos.* 2001, **16**: 69-74.
- 50) Kubota T, Yamaura Y, Ohkawa N, Hara H, Chiba K. Frequencies of *CYP2D6* mutant alleles in a normal Japanese population and metabolic activity of dextromethorphan O-demethylation in different *CYP2D6* genotypes. *Br J Clin Pharmacol.* 2000, **50**: 31-34.
- 51) Steen VM, Andreassen OA, Daly AK, Tefre T, Børresen AL, Idle JR, Gulbrandsen AK. Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics.* 1995, **5**: 215-223.
- 52) Hersberger M, Jacqueline M-J, Rentsch K, Hänseler E. Rapid detection of the *CYP2D6**3, *CYP2D6**4, and *CYP2D6**6 alleles by tetra-primer PCR and of the *CYP2D6**5 allele by multiplex long PCR. *Clin Chem.* 2000, **46**: 1072-1077.
- 53) Dorado P, Cáceres CM, Pozo-Guisado E, Wong M-L, Licinio J, Llerena A. Development of a PCR-based strategy for *CYP2D6* genotyping including gene multiplication of worldwide potential use. *Bio Techniques.* 2005, **39**: 571-574.