

学位論文題名

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*

学位申請者 大田 智子 ㊞

緒言

2003 年にヒトゲノム配列の解読完了以降、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¹⁾。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。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。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。

申請者らは、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^{2,3)}。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。本報では、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。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*, *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。さらにワルファリンの代謝酵素 *CYP2C9* 及びビタミン K 還元酵素複合体 1 *VKORC1* へ応用した。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 を設計して、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 法の開発

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)製) 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 (株生産日本社製) 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 (Figure 1)。プライマーおよび TaqMan プローブは TaqMan SNP genotyping assays (Life Technologies 社製) を用い、装置は ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems 社製) 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 (東洋紡社製)、2 \times KOD FX buffer 2.0 μ L (東洋紡社製)、50 \times ROX reference dye (東洋紡社製) 0.4 μ L、20 \times TaqMan SNP genotyping assays (Life Technologies 社製) 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。

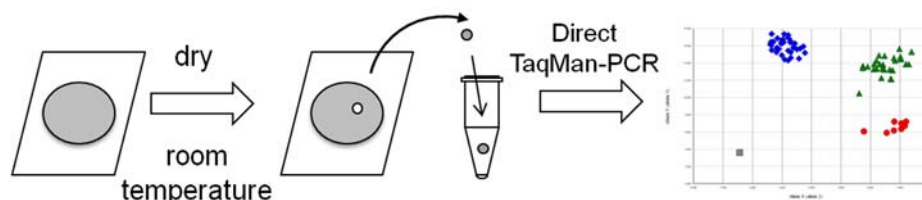


Figure 1 Outline of the direct TaqMan genotyping method using human dried saliva.

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 1.2-mm diameter disk and put into the reaction mixture directly.

ダイレクト TaqMan PCR の結果を Figure 1 中に示した (*CYP1A2*1C* のみ)。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⁴⁾、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。そこで申請者らは、水溶紙が水を加えることで溶けて繊維が分散する性質を利用し、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 (Figure 2)。

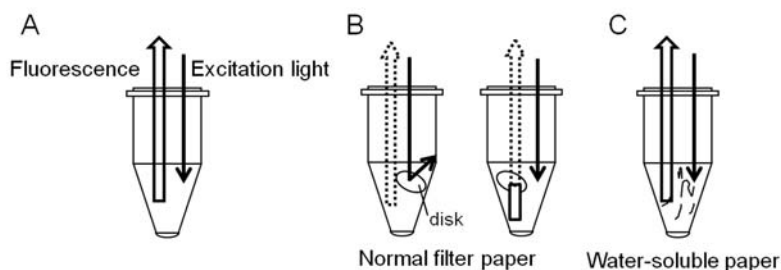


Figure 2 Detection of the fluorescence signal in the TaqMan PCR analysis. (A)

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.

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られる。特に薬剤師が入院患者と接する場合や、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 analysis	○	×	×
DNA extraction	Unnecessary	Necessary	Unnecessary (Wash require)
Pretreatment time	Short	Medium	Long
Cost (¥/sample)	18	3	733

第2節 薬物代謝酵素 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A5 の遺伝子多型のポピュレーション解析

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。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、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。薬の代謝には CYP が主要代謝酵素として知られており、ヒトの代謝に関わる酵素だけでも 20 種類以上の分子種が知られている⁵⁾。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⁶⁾、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⁷⁾。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、リドカイン、テオフィリ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^{8,9)}。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^{10,11)}。*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^{12,13)}、*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र्फア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^{14,15)}。*CYP3A5* はタクロリムスやミダゾラムの代謝に関与している^{16,17)}。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。

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

Gene	Drug substrates ^{18, 19, 20)}
<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, tacrorimus, rifampicine

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)。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²¹⁾。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* 遺伝子において、変異型ホモ接合体 (*3/*3) は検出されなかつ

た (Table 4)。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²²⁾。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 4)^{21,23)}。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 5)。

Table 4 Allele frequencies of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A5 (n=1017).

Gene	Variant allele	This study	Japanese ²¹⁾	Caucasian ²¹⁾
CYP1A2	*1C	0.234	0.319	0.010 ^a
CYP2C9	*3	0.027	0.035	0.056
CYP2C19	*2	0.295	0.345	0.136 ^a
CYP2C19	*3	0.111	0.090	0.000 ^a
CYP2D6	*10	0.427	0.435	0.196 ^a
CYP3A5	*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).

それぞれの CYP 遺伝子多型結果を組み合わせで解析を行った結果、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。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 6)。その中でもっとも多い組み合わせをもつ群は Table 5 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多くても 5%程であり、非常に多様性に富むことが明らかとなった。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 5 Genotype frequencies of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A5 in the Japanese population (n=1017)

Gene	Genotypes	Phenotypes	Number of subjects	Observed frequency (%)
CYP1A2	<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
CYP2C9	<i>*1/*1^a</i>	EM	963	94.7
	<i>*1/*3</i>	IM	54	5.3
	<i>*3/*3</i>	PM	0	0
CYP2C19	<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
CYP2D6	<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
CYP3A5	<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 6 Combined genotype frequency of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A5 in the Japanese population

No.	Genotype					Subject	%
	<i>CYP1A2</i>	<i>CYP2C9</i>	<i>CYP2C19</i>	<i>CYP2D6</i>	<i>CYP3A5</i>		
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 ワルファリン代謝関連酵素遺伝子 *CYP2C9* 及び *VKORC1* の一塩基多型解析への適用

ワルファリンは血栓予防のために最も広く使用されている経口抗凝固薬であり、静脈血栓症の治療も確立されている。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 解析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²⁴⁾。さらに米国食品薬品局は、*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^{10,25,26)}、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。

本学学生に書面による説明を行い、同意が得られた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²⁷⁾。

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 7 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²⁵⁾。*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。*CYP2C9**3 は第2節 Table 5 の1,017名の結果とも一致した。Table 8 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記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。

Table 7 Genotype frequencies of *CYP2C9* and *VKORC1* (%)

Genotype	n	This study (n=186)	Reference ²⁵⁾ (n=341)
<i>CYP2C9</i> *1/*1	180	96.8	95.9
*1/*3	6	3.2	4.1
*3/*3	0	0.0	0.0
<i>VKORC1</i> G/G	1	0.5	0.3
G/A	30	16.1	15.8
A/A	155	83.3	83.9

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であろう。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であろう。特にCYP2C9*1/*3 かつ*VKORC1*A/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 8)、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 8 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					
	*1/*1		*1/*3		*3/*3	
	n	Doses ^{a)}	n	Doses ^{a)}	n	Doses ^{a)}
G/G	1	5-7 mg	0	3-4 mg	0	0.5-2 mg
G/A	28	5-7 mg	2	3-4 mg	0	0.5-2 mg
A/A	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2章 唾液検体を用いた CYP2D6*5 の Nested Long PCR 法の開発

CYP2D6 は、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が、数多くの遺伝子多型の存在が知られている。*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²⁸⁾。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²⁹⁾。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^{30,31)}。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。

第 1 節 プライマー設計・反応条件の検討

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。また、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。*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 (Figure 3)。

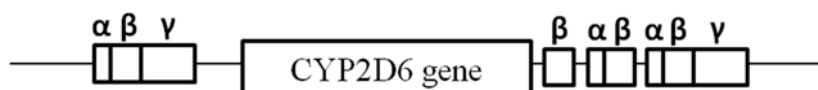


Figure 3 Scheme of repetitive sequences around *CYP2D6* gene

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 反応条件での検討を行った (TOYOBO Technical Review)。

Primer 設計は *CYP2D6* 遺伝子配列解析を行い、*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 primer は特異性を上げるために、報告のある既存の primer にそれぞれ 3' 側に 5 ~10 bp を加えた^{31,32)}。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 9)。

Table 9 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 >

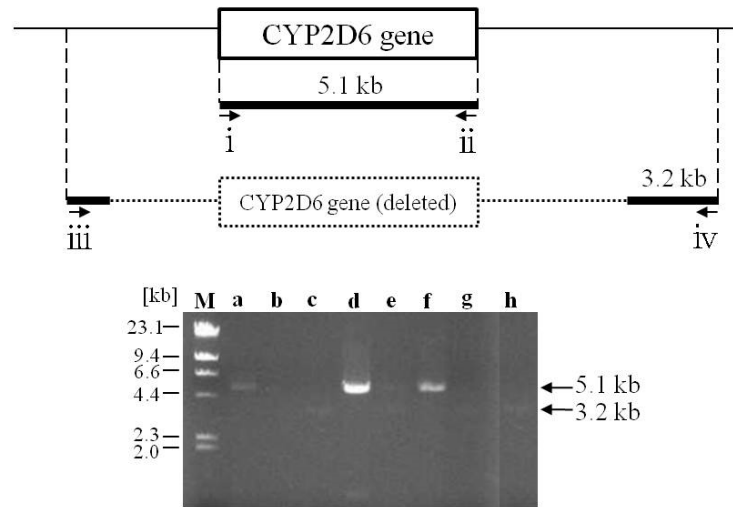
乾燥唾液検体の 2 mm 径ろ紙片を直接 PCR 反応液に添加して *CYP2D6**5 の first-round long PCR 法で行った。PCR 装置は Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems 社製)を使用した。first-round PCR 反応液組成は、2 ×PCR Buffer for KOD FX Neo (KFX-201、東洋紡社製) 12.5 µL、2 mM dNTPs 3.25 µL (KFX-201、東洋紡社製)、15 pmol each of *CYP2D6*_3 and *CYP2D6*_4 primers、30 pmol each of *CYP2D6*_1 and *CYP2D6*_2 primers、KOD FX Neo DNA polymerase (1 U/µL, KFX-201、東洋紡社製) 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 µL、2 ×PCR Buffer for KOD FX Neo 12.5 µL、2 mM dNTPs 3.25 µL、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 µL、滅菌蒸留水 3.25 µL を加え、反応液全量を 25 µL 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。

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 Figure 4 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 (Figure 4A)。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 (Figure 4B)。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さらに簡便な方法が望まれる。

(A) first-round long PCR



(B) Nested long PCR

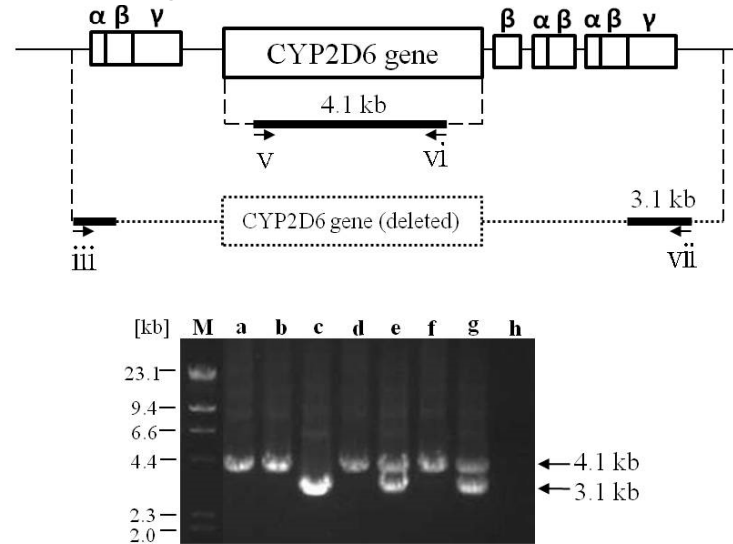


Figure 4 Scheme of long PCR analyses for *CYP2D65.**

(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 CYP2D6*5 遺伝子多型頻度解析

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。対象は本学学生とし、書面による説明を行い同意が得られた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。

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 10)。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したが、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 10 Genotype distribution of CYP2D6*5 in the 78 healthy Japanese volunteers (%)

Genotype	This study	Reference ²⁹⁾
*1/*1	87.2	87.7
*1/*5	12.8	12.3
*5/*5	0	0
Allele frequency	This study	Reference ²⁹⁾
*1	93.6	93.8
*5	6.4	6.2

総括

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。今後これらのゲノム情報をどのように使っていくかで、ゲノム薬理学の可能性が広がっていくと考えられる。本新規遺伝子解析法が個別化医療の発展に向けた大きな一歩となるとことを期待する。

参考文献

- 1) Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Altman RB and Klein TE, Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine, *Clin Pharmacol Ther*, **92**: 414-417 (2012).
- 2) 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*, **26**: 503-505 (2010).
- 3) Hayashida M, Iwao-Koizumi K, Murata S, Yokoyama A, Kinoshita K, Single-Tube Genotyping from a Human Hair Root by Direct PCR, *Anal Sci*, **25**: 1487-1489 (2009).
- 4) Borgiani P, Ciccacci C, Forte V, Sirianni E, Novelli L, Bramanti P and Novelli G, CYP4F2 genetic variant (rs2108622) significantly contributes to warfarin dosing variability in the Italian population, *Pharmacogenomics*, **10**: 261-266 (2009).
- 5) 横井 毅, 薬物代謝酵素の遺伝的多型と個別薬物療法, *化学と生物*, **39**: 368-375 (2001).
- 6) Nebert DW and Russell DW, Clinical importance of the cytochromes P450, *Lancet*, **360**: 1155-1162 (2002).
- 7) Tomalik-Scharte D, Maiter D, Kirchheiner J, Ivison HE, Fuhr U and Arlt W, Impaired hepatic drug and steroid metabolism in congenital adrenal hyperplasia due to P450 oxidoreductase deficiency, *Eur J Endocrinol*, **163**:919-924 (2010).
- 8) Zhou S-F, Yang L-P, Zhou Z-W, Liu Y-H and Chan E, Insights into the Substrate Specificity, Inhibitors, Regulation, and Polymorphisms and the Clinical Impact of Human Cytochrome P450 1A2, *The AAPS Journal*, **11**: 481-494 (2009).
- 9) Backman JT, Karjalainen MJ, Neuvonen M, Laitila J and Neuvonen PJ, Rofecoxib is a potent inhibitor of cytochrome P450 1A2: studies with tizanidine and caffeine in healthy subjects, *Br J Clin Pharmacol*, **62**: 345-357 (2006).
- 10) Yin T, Maekawa K, Kamide K, Saito Y, Hanada H, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Horio T, Takiuchi S, Kawano Y, Minematsu K, Naritomi H, Tomoike H,

- Sawada J and Miyata T, Genetic Variations of *CYP2C9* in 724 Japanese Individuals and Their Impact on the Antihypertensive Effects of Losartan, *Hypertens Res*, **31**: 1549-1577 (2008).
- 11) Lee CR, Goldstein JA and Pieper JA, Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data, *Pharmacogenetics*, **12**: 251-263 (2002).
 - 12) Furuta T, Shirai N, Sugimoto M, Nakamura A, Hishida A and Ishizaki T, Influence of *CYP2C19* Pharmacogenetic Polymorphism on Proton Pump Inhibitor-based Therapies, *Drug Metab Pharmacokinet*, **20**: 153-167 (2005).
 - 13) Thorn CF, Whirl-Carrillo M, Leeder JS, Klein TE, and Altman RB, PharmGKB summary: phenytoin pathway, *Pharmacogenet Genomics*, **22**: 466-470 (2012).
 - 14) Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK, Tanigawara Y, Hosono N, Kubo M, Sasa M, Nakamura Y and Zembutsu H, Dose-adjustment study of tamoxifen based on *CYP2D6* genotypes in Japanese breast cancer patients, *Breast Cancer Res Treat*, **131**: 137-145 (2012).
 - 15) Crews KR, Gaedigk A, Dunnenberger HM, Klein TE, Shen DD, Callaghan JT, Kharasch ED and Skaar TC, Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for Codeine Therapy in the Context of Cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*) Genotype, *Clin Pharmacol Ther*, **91**: 321-326 (2012).
 - 16) Katsakiori PF, Papapetrou EP, Goumenos DS, Nikiforidis GC and 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*, **43**: 385-388 (2011).
 - 17) Miao J, Jin Y, Marunde RL, Kim S, Quinney S, Radovich M, Li L and Hall SD, Association of Genotypes of the *CYP3A* Cluster with Midazolam Disposition *In Vivo*, *Pharmacogenomics J*, **9**: 319-326 (2009).
 - 18) Katja Grasmäcker, Petra Louise Verwohlt, Kai-Uwe Kühn, Aleksandra Dragicevic, Olrik von Widdern, Astrid Zobel, Christoph Hiemke, Marcella Rietschel, Wolfgang Maier, Ulrich Jaehde, Marie Luise Rao. Population pharmacokinetic analysis of mirtazapine. *Eur J Clin Pharmacol*, **60**: 173-480 (2004).
 - 19) Wolf CR, Smith G, Smith RL, Science, medicine, and the future Pharmacogenetics, *BMJ*, **320**: 987-990 (2000).
 - 20) Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, Fava G and Spina E, Allele and genotype frequencies of *CYP2C9*, *CYP2C19* and *CYP2D6* in an Italian population, *Pharmacol Res*, **50**:195-200 (2004).
 - 21) Myrand SP, Sekiguchi K, Man MZ, Lin X, Tzeng R-Y, Teng C-H, Hee B, Garrett M, Kikkawa H, Lon C-Y, Eddy SM, Dostalík J, Mount J, Azuma J, Fujio Y, Jang I-J, Shin S-G, Bleavins MR, Williams JA, Paulauskis JD and Wilner KD, Pharmacokinetics/Genotype Associations for Major Cytochrome P450 Enzymes in Native and First- and Third-generation Japanese Populations: Comparison With Korean, Chinese, and Caucasian Populations, *Clin Pharmacol Ther*, **84**: 347-361 (2008).
 - 22) 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 Pharmacokinet*, **29**: 283-285 (2014).
 - 23) Makeeva O, Stepanov V, Puzyrev V, Goldstein DB and Grossman I, Global pharmacogenetics: genetic

- substructure of Eurasian populations and its effect on variants of drug-metabolizing enzymes, *Pharmacogenomics*, **9**: 847-868 (2008).
- 24) The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. *N Engl J Med*, **360**: 753-764 (2009).
 - 25) Yoshizawa M, Hayashi H, Tashiro Y, Sakawa S, Moriwaki H, Akimoto T, Doi O, Kimura M, Kawarasaki Y, Inoue K and Itoh K, Effect of *VKORC1* –1639 G>A polymorphism, body weight, age, and serum albumin alterations on warfarin response in Japanese patients, *Thromb Res*, **124**: 161-166 (2009).
 - 26) Ohno M, Yamamoto A, Ono A, Miura G, Funamoto M, Takemoto Y, Otsu K, Kouno Y, Tanabe T, Masunaga Y, Nonen S, Fujio Y, Azuma J, Influence of clinical and genetic factors on warfarin dose requirements among Japanese patients, *Eur J Clin Pharmacol*, **65**: 1097-1103 (2009).
 - 27) 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*, **40**, 402-408 (2014).
 - 28) Kubota T, Chiba K, Iga T, Frequency Distribution of CYP2C19, CYP2D6, and CYP2C9 Mutate-alleles in Several Different Populations, *Xenobio Metabol and Dispos*, **16**: 69-74 (2001).
 - 29) Kubota T, Yamaura Y, Ohkawa N, Hara H and 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*, **50**: 31-34 (2000).
 - 30) Steen VM, Andreassen OA, Daly AK, Tefre T, Børresen AL, Idle JR and Gulbrandsen AK, Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology, *Pharmacogenetics*, **5**: 215-223 (1995).
 - 31) Hersberger M, Jacqueline M-J, Rentsch K and 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*, **46**: 1072-1077 (2000).
 - 32) Dorado P, Cáceres CM, Pozo-Guisado E, Wong M-L, Licinio J and LLerena A, Development of a PCR-based strategy for *CYP2D6* genotyping including gene multiplication of worldwide potential use. *Bio Techniques*, **39**: 571-574 (2005).