

薬剤反応性に影響を及ぼす遺伝子多型の簡易迅速検出法の開発とその臨床応用

平塚 真弘

Development of Simplified and Rapid Detection Assay for Genetic Polymorphisms Influencing Drug Response and Its Clinical Applications

Masahiro HIRATSUKA

Department of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University Hospital, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8574, Japan

(Received March 13, 2002)

Clinically important genetic polymorphisms influencing drug metabolism and drug response have typically been discovered on the basis of phenotypic differences among individuals from different populations. Routine genotyping before drug therapy may enable the identification of responders, nonresponders, or patients at increased risk of toxicity. Automated, high-throughput detecting methods for single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are highly desirable in many clinical laboratories. The aim of this study is to develop a high-throughput genotyping method for detecting SNPs influencing drug response in the Japanese population. We have developed three real-time PCR assays for detecting SNPs in the human drug-metabolizing enzymes and drug targets. The assay for simultaneously detecting CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A5, NAT2, TPMT, DPYD, UGT1A1, ALDH2, ADH2, MDR1, CETP, DCP-1, ADRB2, HTR2A, INPP1, SDF1, and mitochondrial DNA polymorphisms takes less than 1.5 h. With the clinical application of NAT2 genotyping, we found statistically significant difference between the incidence of adverse drug reactions (ADRs) and the NAT2 genotype. The incidence of the ADRs was significantly higher in the slow type than the in other two types, as 5 of the 6 patients were of the slowtype, and the other was the intermediatetype, while no patients of the rapidtype has developed any ADRs.

Key words—single-nucleotide polymorphism; pharmacogenetics; real-time PCR

はじめに

薬の効き具合や副作用の出やすさには著しい個人差が存在する。近年、ヒトゲノム・遺伝子解析研究の伸展により、このような薬剤反応性における個人差の原因の1つとして遺伝子の多型性が注目されている。現在、薬物代謝酵素であるチトクロームP450 (CYP) やCYP以外の薬物代謝酵素の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) 解析が加速度的に進展しており、遺伝子多型情報が積み上げられている。これまでに、ヒトにおいて遺伝子多型の存在が報告されているCYP分子種は、CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6,

CTYP2E1, CYP3A4, CYP3A5 及びCYP3A7などがある。¹⁾ 特にCYP2C19及びCYP2D6に関しては数多くの研究結果が報告されている。CYP2C19は消化性潰瘍治療薬のオメプラゾールなどを代謝するが、この分子種のPoor Metabolizer (PM) の頻度は、白人 (約5%) に比べ日本人で高く、約15-20%と推定されている。最近では、ヘリコバクター・ピロリの除菌効率がPMでは著しく高いことを示唆する報告がなされており、患者個々の遺伝情報を基にした処方設計の必要性が指摘されている。^{2,3)} また、CYP2D6は60種類以上の抗うつ薬、抗不整脈薬、抗精神病薬など临床上重要な薬物を特異的に代謝するために、多型性を示すCYPの中では最も重要な分子種である。CYP以外の薬物代謝酵素では、アザチオプリンやメルカプトプリンの代謝に関与するチオプリンS-メチルトランスフェラーゼ (TPMT)、イリノテカンの代謝に関与するUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ 1A1

東北大学医学部附属病院薬剤部 (〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1) 現所属: 東北薬科大学臨床薬剤学 (〒981-8558 仙台市青葉区小松島 4-4-1)

*本総説は、平成14年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

(UGT1A1), 5-FU の代謝の関与するジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ (DPYD), イソニアジドの代謝に関与する *N*-アセチルトランスフェラーゼ 2 (NAT2) などに遺伝的な多型性が存在することが報告されている.⁴⁾ また, 薬物代謝酵素とは別に薬剤の効果に影響を与える遺伝子マーカーや薬物ターゲット分子の SNP も報告されている. 例えば, コレステリルエステル転送タンパク (CETP) 遺伝子の SNP は, 高脂血症薬プラバスタチンの薬効とアソシエートしている. その他にも, アンジオテンシン変換酵素 (DCP-1), β 2 アドレナリンレセプター (ADRB2), セロトニン 2A レセプター (HTR2A), イノシトールポリフォスフェート 1-フォスファターゼ (INPP1) などの SNP が薬効とアソシエートしていることが報告されている.⁴⁾ さらには, ミトコンドリア DNA の遺伝子多型によるアミノグリコシド系抗生物質の高頻度な副作用発現も報告されている.⁵⁾

このように, 現在国内外において, これら薬剤反応性遺伝子の SNP 解析は日進月歩で進展している. しかし, これらの SNP を有する患者に対して, 臨床レベル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非常に少ない. これには少なくとも 2 つの原因が考えられる. 第 1 点として, フェノタイプ-ジェノタイプのアソシエーションスタディがまだ不十分であることにある. つまり, どの遺伝子のどの SNP を検出すれば, どのようなフェノタイプが予測できるかということを明確にする必要がある. また, 第 2 点としては, 臨床現場で運用できるような簡易, 迅速かつ正確な SNP 診断システム・プロトコールが整備されていないこともあげられる. しかし近年, SNP 解析技術は数多く開発されているので, その目的・解析規模などに応じて最適の手法を選択できるようになってきている. 既知の SNP を迅速かつハイスループットで解析 (タイピング) する方法は Invader 法, Sniper 法, TaqMan PCR 法, Hybridization Probe 法, SNP-IT 法, Pyrominisequencing 法, Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) 法, MALDI-TOF/MS 法, NanoChip 法など数多く開発されている. 特に臨床の現場では, 煩雑な操作を必要とせず, 多量の検体を短時間で処理することができ, 様々な SNP の検出系を容易に構築でき, 十分

な技術の標準化, 精度管理や精度保証がクリアされる SNP 簡易診断システムの開発が強く望まれている.

これまでに我々は, 薬剤反応性遺伝子の SNP 検出のために蛍光プローブ (TaqMan Probe, SYBR Green I あるいは Hybridization Probe) を用いたリアルタイム PCR の開発を行ってきた. 現在, リアルタイム PCR 用の検出機器としては, アプライドバイオシステムズの ABI PRISM 7700, 7000, GeneAmp 5700, ロシュモレキュラーバイオケミカルの LightCycler, パイオラッドの iCycler iQ, Cepheid の Smart Cycler などがある. このよう様々な SNP 検出技術と検出機器があるが, 今回は我々が臨床応用 (外来患者の遺伝子診断に対応できるもの) を目指して開発している方法についてのみ述べる. また, それらの臨床応用例についても若干紹介する.

SNP 検出法

Allele-Specific Real-Time PCR Assay 近年, 2 種類の蛍光色素でラベルされたオリゴヌクレオチドである TaqMan プローブを用いて PCR を行い, その際に発光される蛍光を検出することにより, リアルタイムで DNA 増幅を検出することができる TaqMan PCR 法が開発された. すでに TaqMan PCR 法は, DNA, RNA の定量や遺伝子多型診断の診断に応用されている. TaqMan PCR 法による遺伝子多型診断は, リアルタイムで DNA 増幅がモニターできるので, 迅速な遺伝子多型診断を可能にし, さらに, 一度に PCR 装置の well 数分の検体 (本研究で使用した ABI PRISM 7700 では 96 wells) を調べることができる. しかし, 従来の TaqMan PCR では, 野生型対立遺伝子, 変異型対立遺伝子に各々特異的に結合する 2 種類の TaqMan プローブを用い, その結合安定性の差を利用して変異の有無を検出していた (Fig. 1). そのため, これらが特異的に目的の対立遺伝子に結合するための温度条件の設定が容易ではなく, 多種類の薬物代謝酵素遺伝子多型を同時に検出するシステムを構築するには問題があった. また, この方法は, 1 つの多型を検出するのに高価な TaqMan プローブを 2 種類必要とするため経済的にも問題があった. そこで, 我々は, 迅速に多量の検体の処理ができ, かつ複数の薬剤反応性遺伝子 SNP を同時に検出可能なシステム

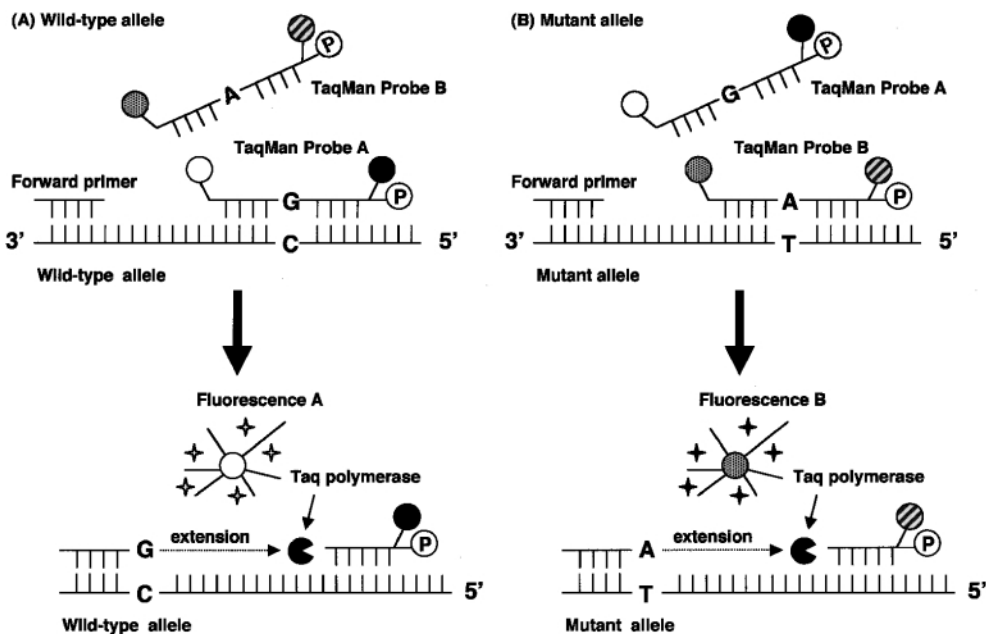


Fig. 1. Principle of Traditional SNP Detection Method with TaqMan Probes

野生型アレルと変異型アレルに各々特異的にアニーリングする2種類の TaqMan プローブ (A 及び B) を作製する。この際、それらのプローブの5'端にラベルされる蛍光色素は異なる波長を有するものを用いる。PCR を行い、伸張反応時に TaqMan プローブが分解され、発生する異なる波長の蛍光を検出し遺伝子型を決定する。

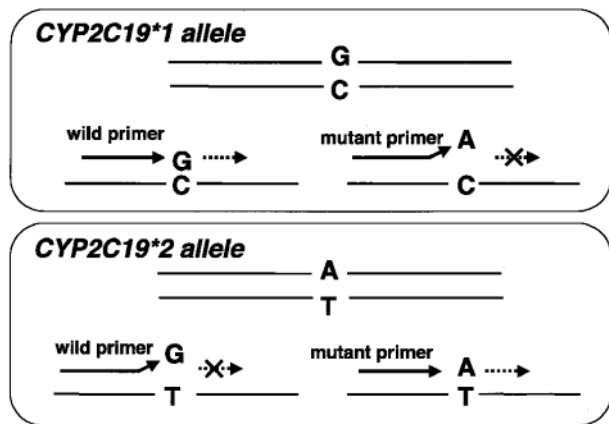


Fig. 2. Principle of SNP Detection Method in the Allele Specific PCR

変異部位の塩基配列が3'端にくるように、野生型アレルあるいは変異型アレルに対してのみ特異的に伸張反応を起こす2種のプライマー (wild primer 及び mutant primer) を設計し PCR を行う。増幅反応が見られれば、その特異的プライマーが反応するアレルを有することになる。

を構築する目的で、対立遺伝子特異的増幅法 (Fig. 2) と TaqMan PCR を組合せた Allele-Specific (AS) Real-Time PCR 法を松原らの方法⁶⁾に準じて開発した (Fig. 3)。その方法を以下に説明する。まず末梢血 200 μ l あるいは唾液 1 ml から常法により DNA を抽出し、それを鋳型として、各薬剤反応性遺伝子の SNP を検出できる対立遺伝子特異的増幅

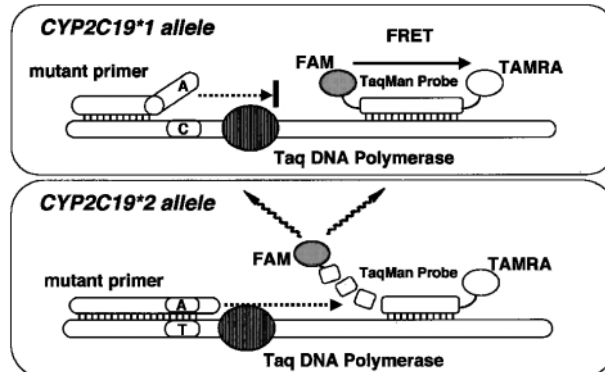


Fig. 3. Scheme of AS Real-Time PCR Assay for Detection of *CYP2C19*2* Allele

野生型アレルに野生型プライマーを用いて反応した場合は、プライマーの完全なアニーリングにより DNA ポリメラーゼで伸張反応が起こり、その過程で TaqMan プローブが分解されて、5'端にラベルされていたレポーター蛍光色素 (FAM) がクエンチャー蛍光色素 (TAMRA) を離れて蛍光発光が生じる。一方、変異型アレルに野生型プライマーを用いた場合は、プライマーの3'端が鋳型 DNA とミスマッチしているため伸張反応が起きず、結果として Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 現象により蛍光が生じない。変異プライマーを用いた場合はこの逆となる。

法用のプライマーセットをそれぞれ設計する。次にそれらの PCR 産物の配列内にハイブリダイズするような5'端を6-carboxyfluorescein (FAM) レポーター蛍光色素、3'端を6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) クエンチャー蛍光色素でラベル

した TaqMan プローブを設計し、対立遺伝子特異的増幅法と組み合わせて PCR を行う。通常、TaqMan プローブ上の 2 種類の蛍光色素は、互いの物理的距離が近いため、FRET (fluorescence resonance energy transfer) 現象によって蛍光強度が低下した状態におかれている。対立遺伝子特異的 PCR プライマーと鋳型 DNA が一致した場合は PCR が進行し、TaqDNA ポリメラーゼの伸張反応によって蛍光標識プローブが分解され、遊離したレポーター色素が蛍光を発する。検出にはアプライドバイオシステムズ社 ABI PRISM, GeneAmp 5700 あるいはロシュダイアグノスティックス社 LightCycler 等を利用し、サイクルごとの蛍光強度を測定することにより、PCR 産物を定量することを可能にしている。反応条件は 50°C で 2 分間、95°C で 10 分間の変性後、95°C で 15 秒、60°C で 60 秒の反応を 35—40 サイクル行う。野生型ホモ接合体、ヘテロ接合体及び変異型ホモ接合体の鑑別は、蛍光強度が検出可能になってくる PCR サイクル数 (Threshold cycle: Ct) を用いている。すなわち、

反応終了後、得られたデータをコンピュータソフト上で自動解析し、野生型プライマーで得られた Ct 値 (Ctwt) から変異型プライマーで得られた Ct 値 (Ctmt) を差し引いた値により、変異の有無を確認した。その大きさが -3 以下であれば野生型ホモ接合体、-3 から 3 の間であればヘテロ接合体、3 以上であれば変異型ホモ接合体であると判断している。

実際に *CYP2C19**2 アレルの検出を例に説明する。上記の反応系に従い、リアルタイム PCR を行った。その結果、横軸に PCR サイクル数、縦軸に蛍光シグナル (ΔRn) をとると、Fig. 4 のようなプロファイルが得られる。ここで、FAM の蛍光強度を蛍光リファレンスである ROX によって補正した標準化蛍光シグナル (Rn) とする。 ΔRn はこの標準化蛍光シグナルから PCR 初期サイクルのレポーター蛍光シグナル (ベースライン) を差し引いた値である。さらに、このプロファイル上で、蛍光シグナルの増加を解析アルゴリズムが初めて検出したサイクル数を Ct とする。今回の検出では、すべての多型検出において ΔRn が 0.200 を越えた時のサイ

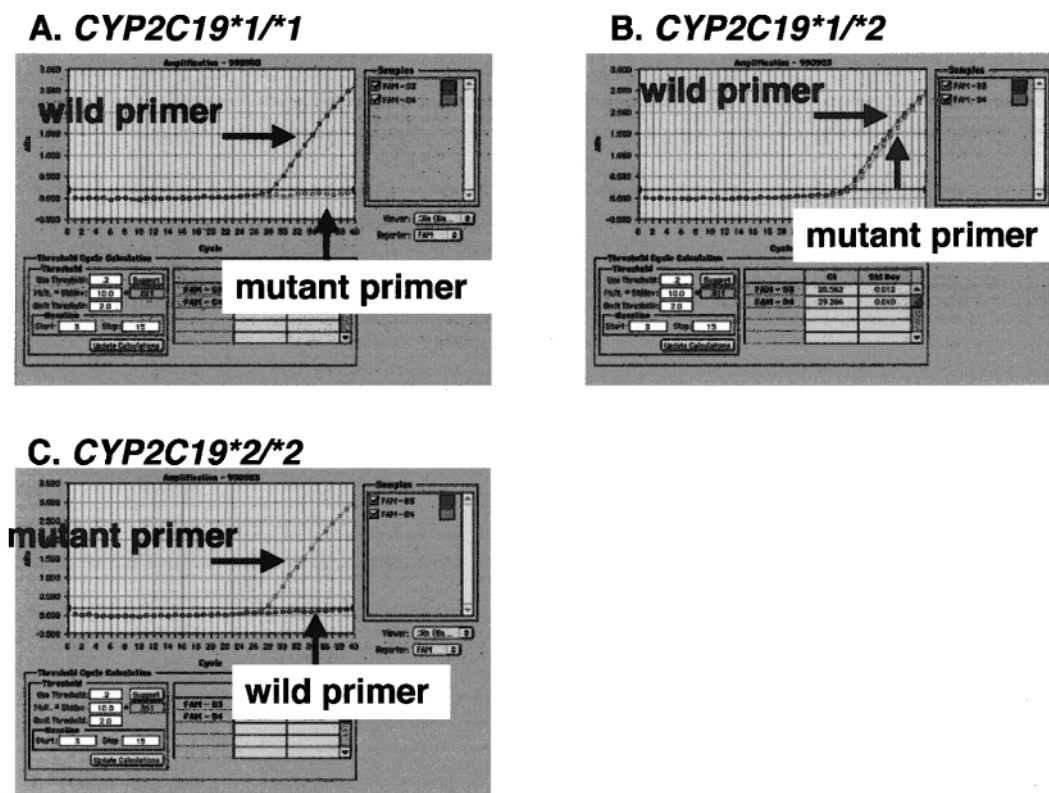


Fig. 4. Profiles of *CYP2C19* Genotyping

横軸は PCR サイクル数を示し、縦軸は蛍光強度を示す。図中の A, B, C は、各々 *CYP2C19**1/*1, *CYP2C19**1/*2, *CYP2C19**2/*2 の増幅プロファイルを示している。

クル数を Ct とした。野生型ホモ接合体 (G/G), ヘテロ接合体 (G/A) あるいは変異型ホモ接合体 (A/A) で, それぞれ特徴的なプロファイルが得られる (Fig. 4)。また, (Ctwt-Ctmt) 値は野生型ホモ接合体, ヘテロ接合体及び変異型ホモ接合体の値に有意な差が認められた ($p < 0.001$) (Fig. 5)。従来法である PCR-RFLP 法により再確認した *CYP2C19* の遺伝子型は, AS Real-Time PCR 法で得られた結果とすべて一致した。

現在までに当研究室においては, Fig. 6 に示した 21 遺伝子 34SNP の検出を同一反応条件で行えるプライマー及び蛍光標識プローブのセットが設計できている。⁷⁻¹⁰ 検出時に, PCR サイクルの増加に伴い, ミスマッチを持つプライマーによっても非特異

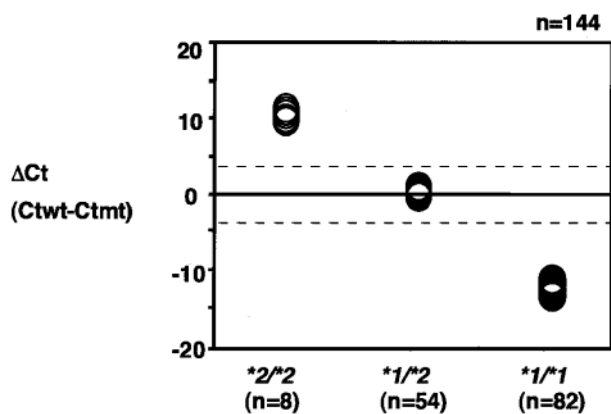


Fig. 5. The Relationship between the Difference of Threshold Cycle (Ctwt-Ctmt) and Genotypes of *CYP2C19**1/*1, *1/*2 and *2/*2

野生型プライマーを用いたときの Ct 値 (Ctwt), 変異型プライマーを用いたときの Ct 値 (Ctmt) を求め, その差 ΔCt (Ctwt-Ctmt) を算出する。これらの値より *CYP2C19* の遺伝子型を客観的に評価できる。

的な増加が認められたものも存在したが, (Ctwt-Ctmt) 値を計算すると, すべてにおいて野生型ホモ接合体, ヘテロ接合体あるいは変異型ホモ接合体の値に有意な差が認められた。これにより, ここにあげたすべての薬剤反応性遺伝子の SNP タイピングが可能となった。

また, TaqMan プローブは比較的高価であり, 診断コストを下げるために対立遺伝子特異的増幅法と SYBR Green を組み合わせて PCR を行った。SYBR Green は二本鎖 DNA に特異的に取り込まれ, 蛍光を発する特徴があり, また, TaqMan プローブと比較すると安価な蛍光色素である。ただし TaqMan プローブを用いた場合, 鋳型 DNA を 2 種のプライマーと 1 種の蛍光プローブの 3 箇所認識するのに対し, SYBR Green 蛍光色素を用いた場合, 2 種類のプライマーのみで鋳型を認識するため, その特異性は若干低下する可能性がある。結果的には我々がターゲットとしたほとんどの SNP において SYBR Green での検出は可能であった。¹¹ さらに, SYBR Green を用いた系はキャピラリー式サーマルサイクラー LightCycler でも応用可能であり, 約 30 分という短時間で SNP の検出が可能となった。

AS Real-Time PCR 法を用いた SNP 検出系は煩雑な操作を必要とせず, 短時間 (約 1.5—2 時間) で多量の検体を処理できる特徴があり, しかも唾液由来の DNA で診断可能であった。従来の対立遺伝子特異的増幅法では, 最終的な PCR 産物の量をゲル上で判定していたために反応条件の厳密な設定が不可欠で, 反応条件のわずかな変動でも偽陽性が出る危険性があった。本法では, PCR の各サイクル

CYP2A6 (*4)
CYP2B6 (*6 or *7)
CYP2C9 (*2, *3)
CYP2C18 (m1, m2)
CYP2C19 (*2, *3)
CYP2D6 (*4, *10, *14, *18, *21)
CYP2E1 (*5)
CYP3A5 (*3, *6)
TPMT (*3C)
NAT2 (*5, *6, *7)
DPYD (*2, *11, *12)
ALDH2 (*2)
ADH (*2)
MDR-1 (3435C>T)

DCP-1 (287-bp Ins/Del)
CETP (Taq I B1 vs B2, 297G>A)
HTR2A (102T>C)
ADRB2 (46A>G, 79C>G)
INPP1 (973C>A)
SDF-1 (3'A vs 3'+)
mtDNA (1555A>G)

21 Genes
34 SNPs

Fig. 6. Simultaneous Detection of 34 SNPs Using AS Real-Time PCR Assay

この論文の投稿時点で, AS-Real Time PCR 法により同時検出できる薬剤反応性遺伝子多型であり, 現在さらに検出多型を増やしている。

で蛍光をモニターし、その増加を経時的に追いかけることで、より精度の高い遺伝子診断が可能である。また、電気泳動のような PCR 後の操作は一切不要なため、簡便であるのみならず、PCR につきものの交叉汚染の心配もない。反応終了後はチューブの蓋を開けることなく廃棄することができる。

Hybridization Probe Assay この方法は、2本の蛍光プローブによる PCR 産物及び SNP のリアルタイム検出法である (Fig. 7)。まず、目的の配列を増幅できるようなプライマーを設計する。次に、それらの PCR 産物の配列内にハイブリダイズするような 3' 端をフルオレセインでラベルしたプローブを設計する。それとは別に 5' 端を LC Red640 蛍光色素でラベルし、3' 端をリン酸化したプローブを設計する。このプローブは、鋳型 DNA にハイブリダイズするときフルオレセインと LC Red640 の 2 つの蛍光色素が 1—5 ヌクレオチドの近距離にあるように設計する。それぞれのプライマーとプローブを一本のキャピラリーに分注し、混合させた反応液中で PCR を行う。アニーリングの際にプローブが鋳型 DNA にハイブリダイズし、2 つの蛍光色素が近づくと FRET 現象によって蛍光を発する。PCR 産物が増加するに従って、アニーリング時に検出される蛍光強度も増加する。さらに

SNP 検出は融解曲線分析によって行われる。反応終了後、蛍光シグナルをモニターしながら、温度をゆっくりと上げて DNA 二重鎖の融点に至るまでのカーブから特異性を決定する。つまり、ある高温に達するとまず Tm の低い方のプローブが解離し、フルオレセインと LC Red640 の距離が離れるため蛍光強度が急激に低下する。プローブ内にミスマッチが存在すると、完全にマッチした配列よりも解離しやすくなり、Tm 値が低い値となる (Fig. 8)。検出には LightCycler を用いて、サイクルごとの蛍光強度を測定することにより、PCR 産物を定量し、また、融解時の蛍光強度を測定することで、PCR 産物のプローブに対する Tm 値の差から SNP を検出することを可能にしている。野生型ホモ接合体、ヘテロ接合体、変異型ホモ接合体の判別は、融解曲線における蛍光強度を $-dF/dT$ でプロットしたときのピーク値 (Tm 値) を用いている。つまり、反応終了後、得られたデータを解析し、融解曲線のピークによって変異の有無を確認した。野生型に特異的な Tm 値のみを示した場合は野生型ホモ接合体、変異型に特異的な Tm 値のみを示した場合は変異型ホモ接合体、2 つのピークを示したときはヘテロ接合体であると診断した。反応温度条件は、95 °C 10 分間処理後、95 °C 15 秒間、50 °C 10 秒間、72

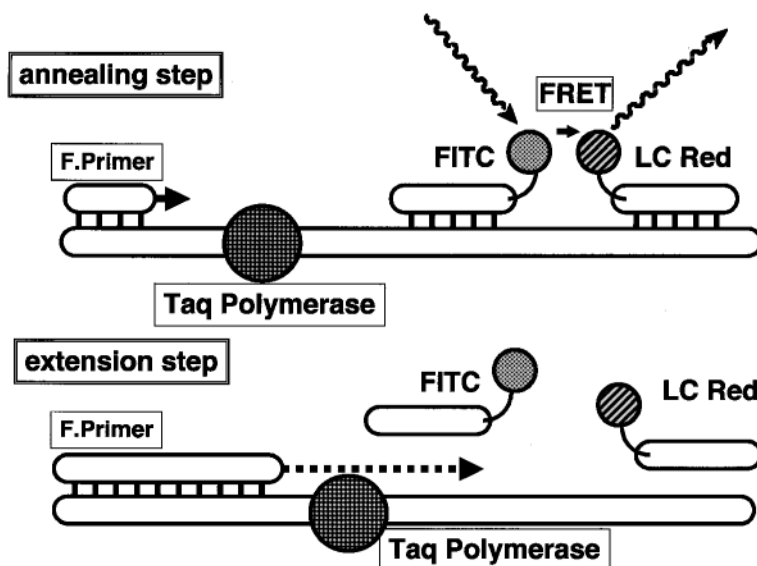


Fig. 7. Principle of Hybridization Probes Format

Hybridization Probe 法は PCR 産物の配列内にハイブリダイズするような 3' 端をフルオレセイン (FITC) でラベルしたプローブと 5' 端を LightCycler Red (LC Red) でラベルし 3' 端をリン酸化したプローブを用意する。2 つの蛍光色素が近づくと FITC の蛍光波長が LC Red を励起し蛍光を発する。その後、フォワードプライマー (F. Primer) の位置から Taq DNA ポリメラーゼによる伸長反応が進行するためプローブは分解される。PCR 産物が増加するに従って、アニーリング時に検出される蛍光強度も増加する。

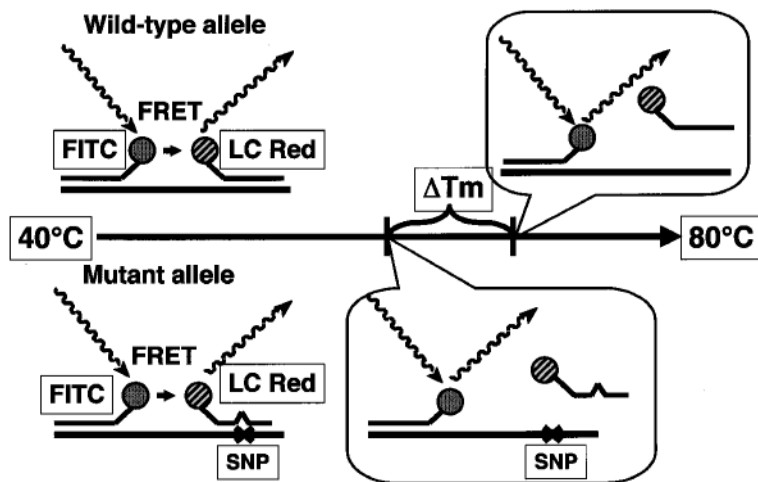


Fig. 8. Principle of SNP Detection Method with Hybridization Probes

SNP 検出は、Melting Curve 解析によって行われる。反応終了後、40°C 付近まで温度を下げ、蛍光シグナルをモニターしながら、温度をゆっくりと上昇させる。変異が存在する場合、その部分に設計した変異検出プローブ（LC Red ラベル）とターゲット間のミスマッチにより、そのハイブリダイゼーションは不安定となり、プローブが変性により解離し、FITC ラベルのアンカープローブと離れて FRET 現象が起らなくなり蛍光が減衰する。野生型ではミスマッチが起らないため、ここではより高い Tm 値でハイブリダイゼーションしている。よって、野生型アレルと変異型アレルでの融解温度に差 (ΔT_m) が生じ、これを利用し遺伝子型を判定する。

°C 10 秒間のサイクルを 40 サイクル行った。その後、95°C 30 秒間、40°C 45 秒間処理後、0.1°C/sec で 80°C まで上昇させ、40°C 30 秒間処理した。

現在、当研究室においては CETP (297G>A), ADRB2 (46A>G, 79C>G), HTR2A (102T>C), Mitochondrial DNA (1555A>G), INPP1 (973C>A) の 6 種類の SNP の Hybridization Probe 法による同時検出系を構築している (Fig. 9)。プライマーとプローブの設計は、以下の点に留意して行った。

- ① フルオレセインと LC Red640 ラベルされたどちらのプローブに SNP が位置するかはプライマーやその配列の GC% を考慮して決定する。
- ② 設計時の基準としては、SNP を配列内に含んでいるプローブの Tm 値を含んでいないプローブのものより 5°C 以上低くする。
- ③ 塩基間の結合強度に注意してプローブを設計する。

特に③に関しては、SNP の有無による融解曲線の Tm 値は、一塩基のみのミスマッチによって差を出すため、塩基間の結合強度が重要な因子となる。例えば、CETP は G→A 変異であり、センス鎖でプローブを設計すると、変異型の鋳型 DNA とプローブのミスマッチは G:T ミスマッチとなる。このミスマッチは非常に安定であり、野生型と変異型のアレル間で Tm の差があまり出ないことが予想される。そこで、より不安定な C:A ミスマッチ

Melting Peak

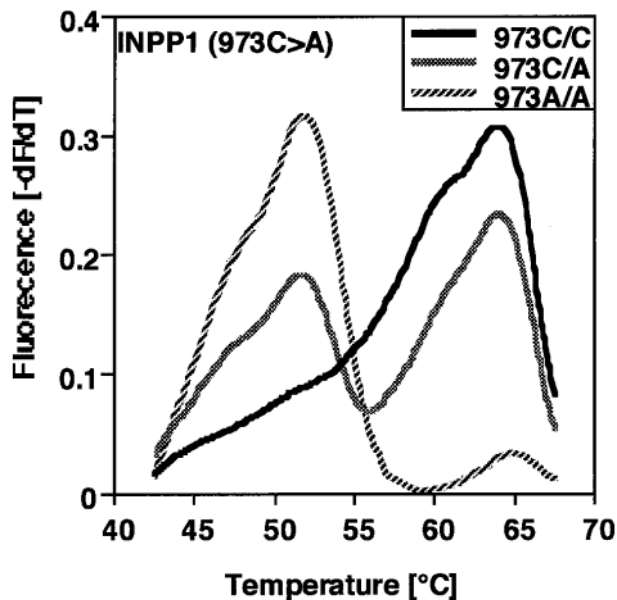


Fig. 9. Profile of Melting Curve Analysis

INPP1 973C>A 変異の検出プロファイルを示す。C/C 型ではプローブとアレル間が完全にマッチしているため、65°C 付近に単一のピークを示している。それに対し、A/A 型ではプローブとアレル間ミスマッチがあるために、それより低い Tm 値 (50°C) で解離している。また、C/A 型はそれらのピークを両方有する 2 峰性のカーブが検出される。

となるようにアンチセンス鎖でプローブを設計した。HTR2A についても同様に、アンチセンス鎖でプローブを設計した。その結果、すべての反応系において、野生型と変異型の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 2 峰性となった。それらの検出結果は、すべて AS-Real Time PCR Assay を用いて診断した結果と一致した。また、この 6 種類の SNP はすべて同一の検出条件で測定可能であった。¹²⁾

この検出法は LightCycler を用いることで反応時間を 40 分に短縮し、融解曲線によって遺伝子多型を迅速に検出する方法である。現在までに、他の施設において、この方法による *TPMT*,¹³⁾ *NAT2*,¹⁴⁾ *CYP2D6**4¹⁵⁾ などの遺伝子多型検出系が確立されている。同法は検出器本体も小型であることから、臨床の場に適用しやすいと考えられる。また、1 本のキャピラリーで検出可能であり、検出後は密閉したまま廃棄することができるため、汚染の危険性も少ない。今回構築した SNP の検出系において、反応温度条件はすべて同一になるように設定しているため、一度に多種類の遺伝子型を検出することが可能である。

ABI PRISM 7700 と LightCycler の比較 現在、当研究室においては基本的に AS Real-Time PCR Assay は ABI PRISM 7700 を用いて、一方 Hybridization Probe Assay は LightCycler を用いて行っているが、それぞれの長所と短所を感じている。つまり LightCycler は温度調節を空気によって行っており、熱伝導率がよいガラスキャピラリーを用いるため、短時間で PCR を行うことが可能である。しかし、それゆえに条件設定が難しく、またガラス製のキャピラリーを用いるためサンプル調製が煩雑であるという欠点をもつ。また、一度に最大で 32 検体しか測定できない。AS Real-Time PCR で用いた ABI PRISM 7700 は最大 48 検体を一度に検出でき、またサンプル調製が比較的簡便であるという利点をもつ。しかし、一つの SNP の検出に 2 本のチューブを必要とする。また、LightCycler に比べると反応時間が長いという欠点がある。

そこで血液から DNA 抽出後、サンプル調製→測定→診断までの所要時間を計測した。まず、1 個人における数種類の SNP について遺伝子診断する場合を想定して検討した。ある 1 個人の検体に対して CETP (297G>A), ADRB2 (46A>G, 79C>G), HTR2A (102T>C), Mitochondrial DNA (1555A>G), INPP1 (973C>A) の 6 種類の SNP を検出し

た。ABI PRISM 7700 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、LightCycler では 1 時間 35 分ですべての操作が終了した。次に 1 種類の SNP について多検体の遺伝子診断をする場合を想定して検討した。CETP (297G>A) 遺伝子多型について 48 サンプルの遺伝子診断を行った。先に述べたように LightCycler では一度に 48 サンプル測定することはできないため、2 回に分けて測定した。その結果、ABI PRISM 7700 は 2 時間 35 分要したのに対して、LightCycler は 3 時間 35 分を要した。この中で、48 検体の調製に要する時間は ABI PRISM 7700 で 35 分であったのに対し、LightCycler では 2 回に分けなければならないため、40 分を要した。コスト面では、AS Real-Time PCR Assay では 1 つの SNP を検出するのに要する費用は 510 円、Hybridization Probe 法では 549 円であり、ほぼ同程度であった。

SYBR Green I PCR/Melting Curve Assay AS Real-Time PCR Assay や Hybridization Probe Assay は一塩基置換のような遺伝子多型の検出には非常に有効であるが、数十～数百塩基の挿入・欠失の遺伝子多型検出への応用は困難である。また、蛍光プローブは比較的高価であり、このプローブを用いない安価な SNP 検出法も求められている。そこで、蛍光色素として SYBR Green I を用いて PCR を行い、PCR 産物のサイズや GC% 含量の違いによる T_m 値の差を利用した Melting Curve 解析により遺伝子型を判定する診断法の構築を試みた。Figure 10 に示したように、SYBR Green I は二本鎖 DNA に取り込まれて蛍光を発するため、この蛍光色素を用いて PCR を行うと、PCR 産物の増幅とともに蛍光強度も増幅される。遺伝子多型検出は Hybridization Probe 法と同様に、Melting Curve 解析によって行った。PCR 終了後、蛍光シグナルをモニターしながら、温度をゆっくりと上昇させると二本鎖 DNA の融点に至り、一本鎖 DNA になる。このとき、二本鎖 DNA に取り込まれていた SYBR Green I が放出され、蛍光強度が急激に低下する。この Melting Curve の最大変化点を、蛍光強度の負の一次微分値 ($-dF/dT$) を温度に対してプロットしたグラフから、異なる T_m の単一のピークとし、遺伝子型を判定する。数十～数百塩基の挿入・欠失の遺伝子多型では、PCR 産物のサイズがそれ

ぞれのアレル間で大きく異なるため、融解温度に差が生じる。このアレル特異的に得られる RCR 産物の T_m 値を利用して遺伝子型の判定を行う。検出にはアプライドバイオシステムズ社の GeneAmp 5700 あるいは LightCycler を用いて行った。5-Hydroxytryptamin transporter (5-HTT) は 44 bp 挿入・欠失型と 125 bp, 167 bp 挿入型などの数種類の遺伝子多型が存在し、セロトニン選択的再取り込み

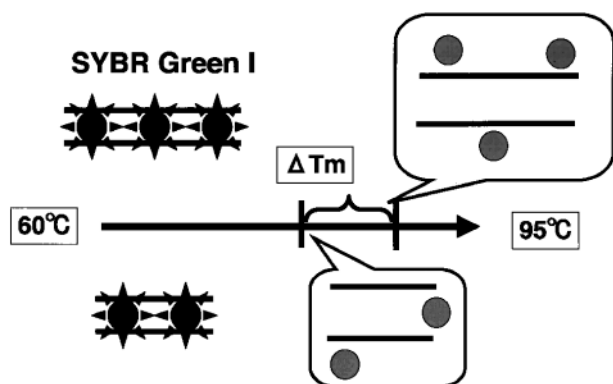


Fig. 10. Schematic Representation of Insertion/Deletion Polymorphisms with SYBR Green I

PCR 終了後、蛍光シグナルをモニターしながら、温度を 60°C から 95°C までゆっくりと上昇させると二本鎖 DNA の融点に至り、一本鎖 DNA になる。このとき、二本鎖 DNA に取り込まれていた SYBR Green I が放出され、蛍光強度が急激に低下する。数十～数百塩基の挿入・欠失による PCR 産物のサイズがそれぞれのアレル間で大きく異なるとこの最大変化点に大きな差 (ΔT_m) が生じる。このアレル特異的に得られる PCR 産物の T_m 値を利用して遺伝子型の判定を行う。

阻害薬 SSRI (serotonin selective reuptake inhibitor) の効果発現と相関性をもつことが示唆されている。今回は 44 bp の挿入・欠失型遺伝子多型の検出を行った (Fig. 11)。挿入塩基部位を挟むようにして設計したプライマーを用いて PCR を行うと、long (l) 型アレルは 103 bp, short (s) 型アレルは 59 bp の PCR 産物がそれぞれ得られた。PCR 後、Melting Curve 解析を行った結果、l 型アレルホモ接合体は T_m 値約 88.6 に単一のピークが得られた。それに対して、s 型アレルホモ接合体は T_m 値 85.0 に単一のピークが得られた。ヘテロ接合体はそれら両方のピークを組み合わせた 2 つのピークが得られた (Fig. 11)。また、同様の方法で、DCP-1 の 287 bp の挿入・欠失多型も検出可能であった。¹⁶⁾

今回構築した挿入・欠失型遺伝子多型検出法は、AS Real-Time PCR 法と異なり、一本のチューブで反応を行うことができるため、約半分のコストで SNP を検出することができる。また、GeneAmp 5700 を用いた場合、一度に 96 の検体を約 2 時間で、LightCycler を用いた場合、一度に 32 の検体を約 40 分で検出することが可能である。AS Real-Time PCR 法や Hybridization Probe 法と比較して、高価な蛍光プローブを用いることなく、安価な SYBR Green I を利用するため、検出コストが低い。また 1 本のチューブ又はキャピラリーで検出可能な

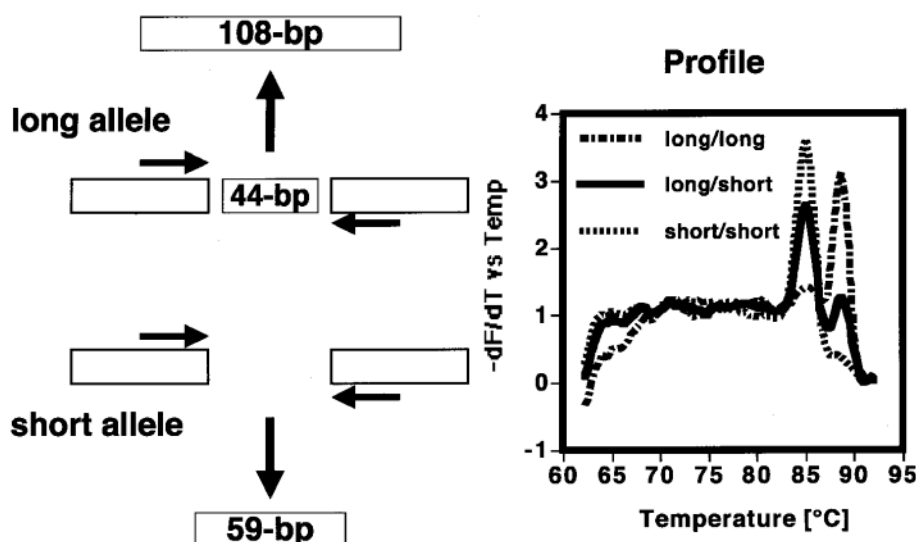


Fig. 11. Melting Curve Analysis with SYBR Green I for Detection of 5-HTT Long/Short Polymorphism

挿入塩基部位を挟むようにして設計したプライマーを用いて PCR を行うと、long 型アレルは 108 bp, short 型アレルは 59 bp の PCR 産物がそれぞれ得られる。long 型アレルホモ接合体は T_m 値約 88.6 に単一のピークが得られた。それに対して、short 型アレルホモ接合体は T_m 値 85.0 に単一のピークが得られた。ヘテロ接合体はそれら両方のピークを組み合わせた 2 つのピークが得られ、これにより遺伝子型の判別が可能となる。

め、サンプル調製が比較的短時間ですみ、一度に多数の検体を処理できるというメリットを持つ。

臨床応用

臨床研究を行う前に 現在、本邦において遺伝子解析研究を行う場合は、3省庁による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守しなければならない。我々の研究も基本的に本邦における「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び「東北大学医学部附属病院における遺伝子診断及び遺伝子解析研究における遵守事項」を基本原理として行われている。しかし、実際の現場では、倫理指針の制定が最近行われたこともあり、まだ手探り状態で研究を進めている施設が多いのではないだろうか。下記に、我々が行っている遺伝子解析研究の流れを示した。

- ① 検体採取の方法など研究プロトコルの作成
- ② 臨床医への依頼
- ③ 倫理委員会へのプロトコル提出、審査、修正、承認
- ④ 薬剤師による患者への説明同意
- ⑤ 医師あるいは看護婦による検体採取
- ⑥ 薬剤部での個人情報匿名化
- ⑦ 遺伝子解析
- ⑧ データベース化
- ⑨ 医師への報告書作成
- ⑩ 処方設計の修正協議
- ⑪ 患者の容態観察、改善確認
- ⑫ 倫理委員会へ研究状況の報告

***NAT2* 遺伝子多型検出によるイソニアジド投与患者の副作用発現回避** 結核治療薬イソニアジド (INH) の *N*-アセチル化能の個人差も、ヒトにおける *N*-acetyltransferase2 (*NAT2*) 遺伝子の多型性によって引き起こされることが古くから知られている。*NAT2* はアセチル化活性により rapid acetylator (RA), intermediate acetylator (IA), slow acetylator (SA) に分類される。SA の頻度は白人種では約 50% であるのに対して、日本人では約 10% である。現在 10 種類以上の変異が見い出されているが、日本人では *NAT2**4 (野生型アレル) 以外の 3 種類の変異 (*NAT2**5, *NAT2**6 及び *NAT2**7) でほぼ 100% の SA を説明できる。現在、当研究室において、INH 投与患者における副作用発現と *NAT2* 遺伝子多型に関する数症例を経験し、遺伝子

診断による副作用発現回避システムの構築を行っており、ここでは、その一部を紹介する。

症例 1 患者は、混合性結合織病及び突発性血小板減少性紫斑病と診断された 25 歳の女性である。免疫抑制作用のためプレドニゾロン、またプレドニゾロンの胃腸障害防止・治療のためファモチジン及びテプレノン、プレドニゾロンの易感染防止のため INH、貧血改善のためアスコルビン酸とクエン酸第一鉄ナトリウム、不眠症状のためエチゾラムを投与された。薬物療法を開始後から悪心・嘔吐は発現した。それら副作用の発現は週 2 回で、朝の服薬後約 1 時間であった。薬物動態に影響を及ぼす肝機能及び腎機能の指標となる AST, ALT, BUN には特に異常値は見い出されなかった。また、服用薬剤の薬学的管理の結果、重複投与、投与禁忌、慎重投与、相互作用などは認められなかった。服用薬剤の悪心・嘔吐の発現頻度を調べたところ、クエン酸第一鉄ナトリウムの副作用である可能性も否定できなかった。しかし、副作用発現時期が INH の服用日と一致するため、その代謝酵素である *NAT2* の遺伝子多型を疑った。本研究は東北大学医学部倫理委員会より承認されたプロトコルに則り、患者に十分な説明がなされ同意が得られた後行われた。ゲノム DNA は、末梢血 200 μ l より抽出した。抽出には、QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン) を用いた。*NAT2* 遺伝子多型の検出は、AS Real-Time PCR 法を用いた。*NAT2* 遺伝子型を解析した結果、野生型の遺伝子型が *NAT2**4/*4 であるのに対し、患者の遺伝子型は *NAT2**7/*7 の変異型ホモ接合体であった。これらの結果を基に、担当医、担当薬剤師及び筆者らの間で、同薬剤の投与を中止することとした。その後、患者の悪心・嘔吐は消失した。

症例 2 患者は、全身性エリテマトーデスと診断された 41 歳の男性である。免疫抑制作用のためプレドニゾロン、プレドニゾロンの易感染防止のため週 2 回 INH を投与された。また、酢酸トコフェロール、アスコルビン酸及びベラプロストナトリウムも補助的に投与された。薬物療法開始後約 1 ヶ月を経過した際、INH 投与日に限り 39°C 台の発熱が出現した。副作用の発現は週 2 回で、朝の服薬後約 1 時間であった。薬物動態に影響を及ぼす肝機能及び腎機能の指標となる AST, ALT, BUN には特に異常値は見い出されなかった。また、服用薬剤の薬

学的管理の結果、重複投与、投与禁忌、慎重投与、相互作用などは認められなかった。症例 1 と同様に、患者の *NAT2* 遺伝子型を解析した結果、*NAT2* *6/*7 の変異型コンパウンドヘテロ接合体であった。これらの結果を基に、担当医、担当薬剤師及び報告者の間で、同薬剤を他剤に変更することとした。その後、患者の発熱は消失した。

これらの症例の他にも、Table 1 に示したような *NAT2* 遺伝子多型が原因と予想される副作用発現例が見い出され、現在では、Fig. 12 に示すような遺伝子診断による副作用回避システムを実際の臨床の現場で試験的に運用している。もし、*NAT2* 遺伝子多型とこのような副作用発現の関係が明確になれば、薬物療法開始前に *NAT2* 遺伝子多型を判定することにより、副作用の発現しやすい患者を推定す

Table 1. Associations of *NAT2* Genotypes and INH Induced -ADRs

No.	Side effects	Genotypes (wild-type: *4/*4)	INH-treatment	Results
1	Nausea Vomiting	<i>NAT2</i> *7/*7	Stop	Improved
2	Fever	<i>NAT2</i> *6/*7	Substitution	Improved
3	Eruption	<i>NAT2</i> *5/*7	Continue	Anti-histamine
4	Visual impairment	<i>NAT2</i> *6/*6	Decrease	Improved
5	Peripheral neuritis	<i>NAT2</i> *6/*7	Stop	Ease
6	Peripheral neuritis	<i>NAT2</i> *4/*6	Stop	Ease

ることが可能となる。欧米では SA の頻度が約 50 % と報告されているが、わが国では約 10 % と少ない。しかし現在、結核治療や感染予防に INH は広く用いられているため、日本人でもその代謝酵素のジェノタイプングは非常に重要であると言える。また近年、結核患者数が増加の傾向にあるため、INH を投薬される患者はますます増加し、SA に対する副作用防止の対策が必要となってくるであろう。

その他の臨床応用

(1) 結核患者におけるアミノグリコシド系抗生剤による難聴回避のためのミトコンドリア DNA 遺伝子診断
ミトコンドリア DNA の 1555 番目の A が G に変異しているタイプでは、ストレプトマイシンやゲンタマイシンなどのアミノグリコシド系抗生剤の投与により、不可逆的な感音性難聴になりやすいことが報告されている。この変異を有する人の頻度は欧米人で約 200—300 人に 1 人である。日本人においても、約 350 人に 1 人の頻度で存在することが当研究室の連結不可能匿名化によるパイロットスタディーで示されている。よって結核患者などでストレプトマイシンを投与される患者に対して、あらかじめミトコンドリア DNA の遺伝子診断を行うことが、それら薬剤の副作用を回避する意味で重要である。我々はミトコンドリア DNA1555 変異のリアルタイム検出系を構築し、同薬剤投与予定の入院患者に対して遺伝子診断を行っている。現在までに、ミトコンドリア DNA1555 変異を有している患者は見い出されていないが、今後も遺伝子診断を継

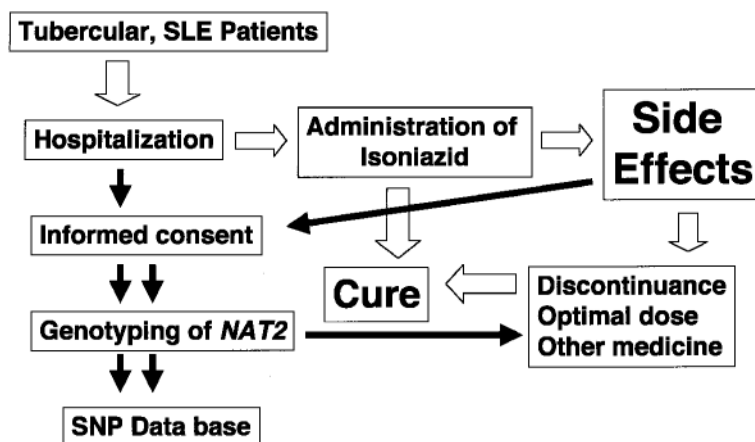


Fig. 12. Scheme of Genetic Testing in Tohoku University Hospital

東北大病院ではイソニアジドの投与が行われる結核や全身性エリテマトーデスの患者が入院すると直ちにインフォームドコンセントがなされ、*NAT2* の遺伝子診断がなされる。これらの情報はデータベースにより管理され、イソニアジド投与後、副作用が観察され、かつ原因が *NAT2* の遺伝子変異による場合は、処方変更がなされるシステムとなっている。

続して患者の副作用発現回避を行っていく。

(2) 急性白血病患者におけるメルカプトプリン投与による副作用発現と *TPMT* 遺伝子多型の解析
急性白血病患者の緩解期にメルカプトプリンが投与されるが、同薬剤の副作用として、骨髄抑制や肝機能障害等が発現する症例がある。この原因は様々な因子が考えられているが、その中の1つとしてメルカプトプリンの代謝酵素であるチオプリンS—メチルトランスフェラーゼ (*TPMT*) の SNP により、酵素活性が減弱し、薬物血中濃度が上昇するためであることが示唆されている。我々はすでに日本人集団における *TPMT* のコモンミュレーションが *TPMT**3C であることを見出ししている。^{17,18)} そこで、実際にメルカプトプリン投与患者で副作用が発現している症例において、*TPMT* の遺伝子診断を行っている。現在までに、当院でメルカプトプリンの副作用を発現している患者において、*TPMT**3C の存在は確認されていない。しかし、これは代謝に影響を与える新規 SNP の存在を示唆するものであり、現在、同患者の *TPMT* 遺伝子の塩基配列を解析中である。

(3) 糖尿病患者における *CYP2C9* 遺伝子多型診断による経口糖尿病薬の適正投与量の設定
経口糖尿病薬トルブタミドは *CYP2C9* によって代謝される。日本人集団に特徴的な SNP である *CYP2C9**3 アレルは、酵素活性の低下をまねくが、日本人の約 25 人に 1 人はヘテロ接合体である。現在、我々はトルブタミド投与患者において *CYP2C9* の遺伝子診断を行い、薬物血中濃度及び治療効果との相関関係を解析している。

まとめ

近年、遺伝子工学が加速度的に発展し、薬剤反応性遺伝子をはじめ数多くの遺伝子多型が検出されている。これらは病気の発症や投薬に対するレスポンスの差異を規定している因子であると考えられている。現在、SNP 情報を利用し、薬のレスポンドあるいはノンレスポンドを判断して、患者個々に適した処方設計がなされるテーラーメイド医療が展開されようとしている。それらの医療を効率的に行っていくためには、実際の医療現場で、患者がどのタイプの遺伝子を持つかを迅速に判定する手段がなければならない。最近、遺伝子型を判定する手段として、DNA チップが注目されている。DNA チップ

は、数千から数万種類の遺伝子が張り付けられていた 0.5—数 cm 角のチップであり、このチップ上に調べたいサンプルを 1 滴たらずと遺伝子の塩基配列の違いを迅速に判定することができる。実際に *CYP* のいくつかの SNP に関しては、欧米人に特徴的な SNP ではあるが、すでに上市されている。しかし、DNA チップは現時点で診断コストが非常に高い。よって、まだ一般的に臨床応用することは非常に難しく、特別な施設のみでそれらの利用が可能になっている。我々の構築した SNP 簡易迅速検出システムは、その汎用性から多くの施設に導入することが可能であり、即戦力として最先端医療に対応できると考えている。将来、テーラーメイド医療が展開され、薬剤反応性遺伝子の SNP に由来する代謝能力別に群を分けて、必要最小限の薬物投与量の設定を行えば、より安全で経済的効率の良い薬物療法が可能になるであろう。さらに医療品開発の治験段階であらかじめ代謝欠損者を治験対象から除外することにより、医薬品開発の時間やコストも大きく減らすことができる。つまり、このような医療が展開されることは、患者の個人的なメリットはもちろん、企業のメリットも大きい。将来的には、外来に通院する患者に対して、それぞれの ID カードにメモリーされている性別や血液型などの情報とともに薬剤反応性遺伝子の SNP 情報も記憶され、有効利用されることが期待される。

謝辞
本研究を遂行するにあたり、終始御指導御鞭撻を賜りました水柿道直東北大学医学部附属病院教授・薬剤部長に深謝いたします。本研究は東北大学医学部附属病院薬剤部で行われたものであり、ご協力いただきました大学院生や薬剤師の先生をはじめとする共同研究者の方々と検体の提供をいただきました多くの方々に心より感謝いたします。なお、本研究の一部は創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業の補助金によって行われたものであり、併せて感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/default.htm>.
- 2) Furuta T., Ohashi K., Kamata T., Takashima M., Kosuge K., Kawasaki T., Hanai H., Kubota T., Ishizaki T., Kaneko E., *Ann. In-*

- ter. Med.*, **129**, 1027–1030 (1998).
- 3) Furuta T., Shirai N., Takashima M., Xiao F., Hanai H., Nakagawa K., Sugimura H., Ohashi K., Ishizaki T., *Pharmacogenetics*, **11**, 341–348 (2001).
 - 4) Ingelman-Sundberg M., *J. Inter. Med.*, **250**, 186–200 (2001).
 - 5) Prezant TR., Agapian JV., Bohlman MC., Bu X., Oztas S., Qiu WQ., Arnos KS., Cortopassi GA, Jaber L., Rotter JI., Shohat M., Fiscel-Ghodsian N., *Nature Genet.*, **4**, 289–294 (1993).
 - 6) Matsubara Y., Fujii K., Rinaldo P., Narisawa K., *Acta Paediatrica*, **88**, 65–68 (1999).
 - 7) Mizugaki M., Hiratsuka M., Agatsuma Y., Matsubara Y., Fujii K., Kure S., Narisawa K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**, 199–205 (2000).
 - 8) Hiratsuka M., Agatsuma Y., Omori F., Narahara K., Inoue T., Kishikawa Y., Mizugaki M., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1131–1135 (2000).
 - 9) Hamdy S. I., Hiratsuka M., Narahara K., El-Enany M., Moursi N., Ahmed MS-E., Mizugaki M., *Br. J. Clin. Pharmacol.* in press.
 - 10) Hamdy S. I., Hiratsuka M., Narahara K., El-Enany M., Moursi N., Ahmed MS-E., Mizugaki M., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* in press.
 - 11) Hiratsuka M., Agatsuma Y., Mizugaki M., *Mol. Genet. Metab.*, **68**, 357–362 (1999).
 - 12) Hiratsuka M., Narahara K., Hamdy S. I., Endo N., Kishikawa Y., Agatsuma Y., Matsuura M., Inoue T., Tomioka Y., Mizugaki M., *Clin. Biochem.* in press.
 - 13) Schutz E., von Ahlsen N., Oellerich M., *Clin. Chem.*, **46**, 1728–1737 (2000).
 - 14) Blomeke B., Sieben S., Spotter D., Landt O., Merk H. F., *Anal. Biochem.*, **275**, 93–97 (1999).
 - 15) Schur B. C., Bjerke J., Nuwayhid N., Wong, S. H., *Clin. Chim. Acta*, **308**, 25–31 (2001).
 - 16) Hiratsuka M., Kishikawa Y., Narahara K., Inoue T., Hamdy S. I., Agatsuma Y., Tomioka Y., Mizugaki M., *Anal. Biochem.*, **289**, 300–303 (2001).
 - 17) Hiratsuka M, Inoue T., Omori F., Agatsuma Y., Mizugaki M., *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, **448**, 91–95 (2000).
 - 18) Hiratsuka M, Inoue T., Omori F., Agatsuma Y., Mizugaki M., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1090–1093 (2000).