

薬物応答性に関する遺伝子多型解析とその臨床応用

井上 和幸

Analysis and Its Application for Prevention of Side-Effects of Drugs and for Evaluation of Drug Responsiveness

Kazuyuki INOUE

Department of Pharmaceutical Science, Akita University Hospital, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan

(Received February 9, 2004)

The response of patients to drugs can be affected by genetic polymorphisms/defects in drug metabolizing enzymes, transporters, and receptors. Genetic polymorphisms/defects are generated by mutation of coding regions and/or non-coding regions of target genes, such as single-point mutations, deletions/insertions, variation in the number of tandem repeats, etc. If a genetic defect in a patient which affects drug response were known, it would be possible to optimize medications individually. The author developed two improved methods for detecting *CYP2C19**2 and *CYP2C19**3. Using the methods, the type of *CYP2C19* gene was examined in 80 inpatients, and the medication status of patients with the mutation was examined focusing on dosage and side effects. The author also examined polymorphisms of the serotonin transporter/biosynthetic or metabolizing enzymes in depressive patients treated with fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, and the relationship between clinical efficacy and polymorphisms was investigated. As a result, patients with the *S/S* genotype of 5-HTTLPR were found to experience better clinical efficacy.

Key words—Genetic Polymorphism; *CYP2C19*; Clinical application; serotonin transporter; drug response

はじめに

薬物代謝酵素、薬物受容体あるいは薬物輸送担体など薬物の応答に関わるタンパクには遺伝的多型が存在するものが知られている。遺伝的多型はそのタンパクをコードする遺伝子領域又はその周辺領域に変化(変異や繰り返し配列の増減など)が生じ、タンパクの発現量や活性に影響を与えることにより起こる。薬物応答性に関するタンパクの欠損により、薬物が効きすぎて副作用を生じたり、薬物が効きにくくなったりする。薬物治療に際し、患者個々の薬物応答性タンパクの欠損の有無を把握できれば、効果的かつ適切な医療の提供が可能になる。そこで、筆者は、日本人の約20%が酵素欠損者であり、遺伝子型から表現型すなわち酵素活性の有無が同定可能である^{1,2)}ことが報告されている薬物代謝酵素チトクローム P450(*CYP*)2*C19*に着目し、その

主な変異アレルである *CYP2C19**2 と*3 を簡便に遺伝子タイピング可能な検出系の構築について検討した。さらに、構築した方法を用いて患者の遺伝子タイピングを行い、酵素欠損の予測に基づく服用薬剤の副作用発現モニタリングへの応用について検討した。また、臨床応用として、当院精神科との共同研究により、うつ病患者におけるセロトニン系遺伝子多型を解析し、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)に対する応答性との関連性について検討したので、以下にその詳細について述べる。

1. 迅速、簡便な *CYP2C19**2, *3 タイピング法の開発

1-1. Polymerase Chain Reaction (PCR) 同時増幅条件を用いた解析法の構築³⁾ *CYP2C19* は、代表的な薬物代謝酵素 *CYP* の1分子種であり、抗不安薬ジアゼパム、プロトンポンプ阻害薬オメプラゾール、抗てんかん薬フェニトインなどの代謝への関与が報告されている。⁴⁻⁶⁾ *CYP2C19* には遺伝子多型が存在し、日本人において酵素欠損が予想される変異アレルを有する者が約20%と欧米人の2—5%に比べ、高頻度で存在する。⁷⁾ *CYP2C19* の酵素欠損

秋田大学医学部附属病院薬剤部 (〒010-8543 秋田市内道 1-1-1)

e-mail: kazinoue@hos.akita-u.ac.jp

*本総説は、平成15年度日本薬学会東北支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

の原因は一塩基変異 (SNP) に起因することが知られ、現在数種類の遺伝子多型が報告されているが、第5エクソン上の681番目のグアニンからアデニンへのSNPである*2、第4エクソン上の636番目のグアニンからアデニンへのSNPである*3の2種類のSNPを解析することで日本人における酵素欠損者の99%以上が検出可能であると報告されている。⁸⁾ 従来、これら2種類のCYP2C19遺伝子変異の検出には、モリスらにより報告されたPCR Restrict Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) 法が用いられてきた。⁷⁾ この方法は、*2、*3の変異を含む領域をそれぞれ異なるPCR条件にて増幅し、得られたPCR断片を*2は *Sma* I、*3は *Bam* HI を用いて処理することによりタイピングを行う方法である。そのため従来のCYP2C19遺伝子タイピングは解析結果が得られるまで、約14時間を要していた。そこで、筆者は、迅速・簡便なタイピング法の構築を目的として、*2、*3の2つの変異領域を、同時に増幅可能なPCR条件を検討するとともに制限酵素などの至適化を行った。始めに、モ

リスらが報告した*2、*3それぞれのPCR条件で、両変異を含む領域を同時に増幅することが可能か検討した。その結果、バンド強度の点から*2の条件より、*3の条件の方が適することが明らかとなった。続いて*3のPCR条件のアニーリング温度と時間、伸長反応時間を変えた4種類の条件を検討することにより、PCR条件の至適化を行った。さらに、鋳型DNA量、制限酵素量、制限酵素処理時間についても検討した (Fig. 1 and Table 1)。その結果、鋳型DNA量100 ngを用いて、アニーリング温度53°Cで1分間、伸長反応を72°Cで1分間にてPCRを行い、制限酵素量5Uで45分間処理をして

Table 1. Optimization of Amount of Genomic DNA, Restriction Enzymes, and Incubation Time

	CYP2C19*2	CYP2C19*3	Optimized condition
Template DNA	≥100 ng	≥10 ng	≥100 ng
Restriction enzyme	≥5 U	≥5 U	≥5 U
Incubation time	≥45 min	≥10 min	≥45 min

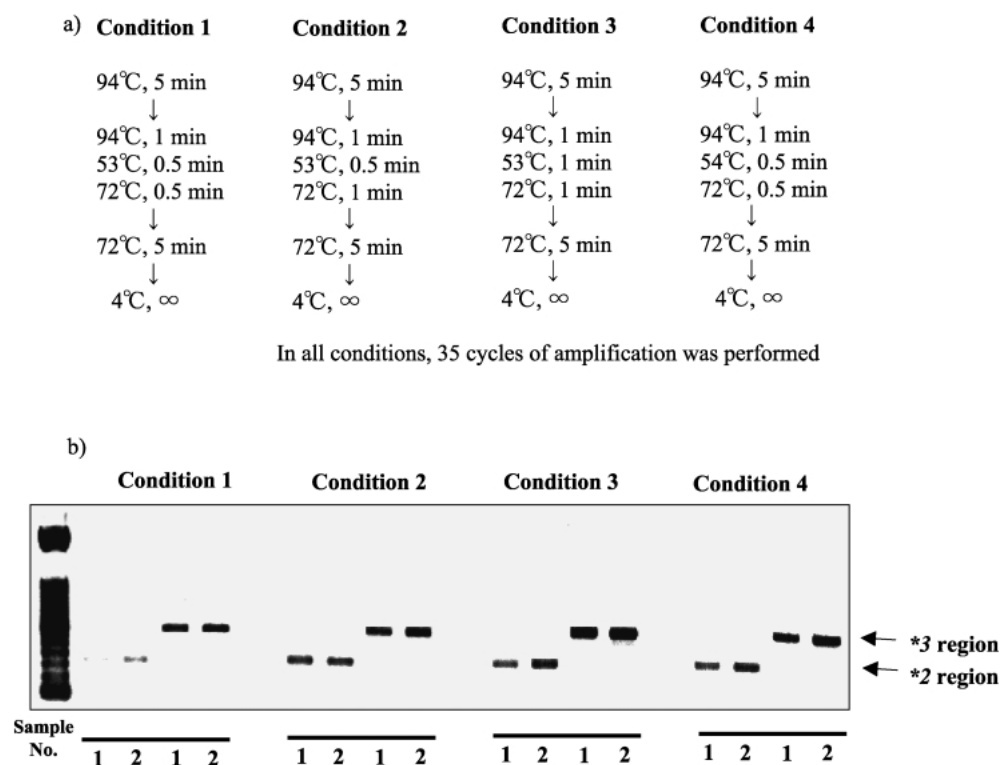


Fig. 1. Optimization of PCR Condition for Simultaneous Amplification of Both CYP2C19*2 and *3 Regions

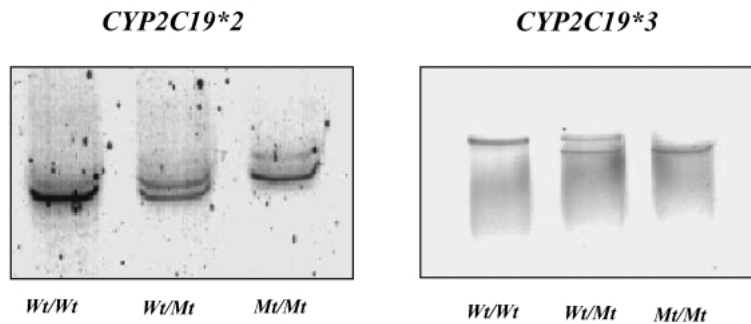
a) Our selected four PCR conditions based on the PCR condition for amplification of CYP2C19*3 region reported by de Morais *et al.* b) Electrophoresis patterns of PCR products of CYP2C19*2 and *3 regions in two randomized healthy volunteers using each four PCR condition. Electrophoresis was run under 100 V for 20 min using 3% agarose gel.

タイピングを行う至適条件を見出すことに成功した。以上のことより、従来法で DNA 抽出からタイピングまで約 14 時間程度かかっていた解析が、今回構築した迅速・簡便なタイピング法を用いることにより、約 6 時間で解析が可能となった。

1-2. PCR Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) を用いた解析法⁹⁾ *CYP2C19* *2, *3 が SNP であることに注目し、点変異の検出法として広く用いられる PCR-SSCP を利用したタイピング法を構築した。あらかじめ、上述の PCR-

RFLP に基づく遺伝子タイピング法を用いて遺伝子型を同定した検体を PCR-SSCP 解析した結果、*2, *3 ともに野生型ホモ、野生型・変異型ヘテロ、変異型ホモそれぞれを同定可能であった。さらに、健康人 5 名について PCR-SSCP 解析を行ったところ、あらかじめ PCR-RFLP で得られた結果と一致したことから、本法は遺伝子タイピング法として有用であることが明らかとなった (Fig. 2)。この方法を用いれば、PCR-RFLP 法のような制限酵素処理の必要がなく、簡便に遺伝子型のタイピングが可

a) SSCP Patterns of PCR Products of *CYP2C19**2 and *3 alleles



b) PCR-SSCP Analysis of *CYP2C19**2 and *3 alleles of Five Healthy Individuals

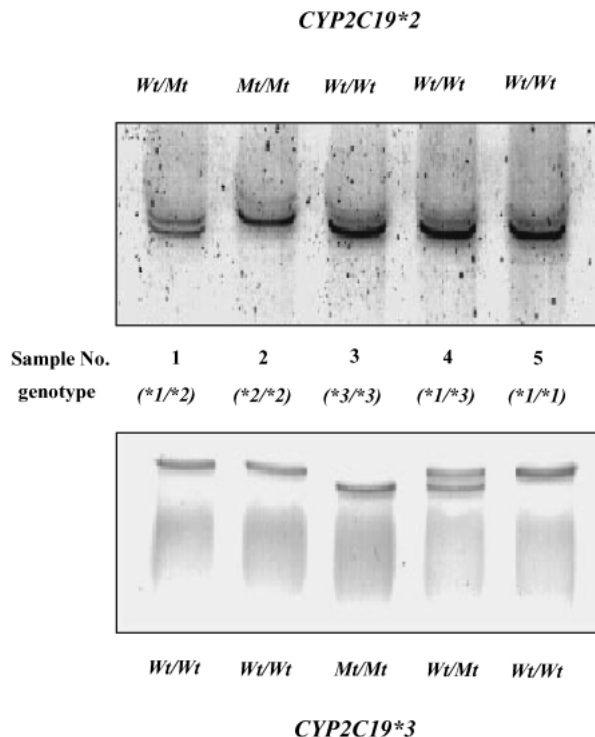


Fig. 2. PCR-SSCP Analysis of *CYP2C19**2 and *3 Regions

a) SSCP patterns of PCR products of *CYP2C19**2 and *3 regions. The genotype of tested samples was predetermined by PCR-RFLP analysis. b) PCR-SSCP analysis of five healthy individuals.

能であり、また、CYP2C19 遺伝子上の新規な SNP の検出への応用も可能であると考えられる。

2. 薬物治療中の患者における CYP2C19*2, *3 タイピングと副作用発現モニタリングへの応用¹⁰⁾

1章で述べた CYP2C19*2, *3 同時増幅系を用いて、酵素欠損に起因する薬物の副作用をモニタリングするため、秋田大学医学部附属病院に入院中で薬物治療を受けている 80 名の患者について CYP2C19 の遺伝子タイピングを行い、そのうち酵素欠損群であると予想された患者について、服薬調査を行った。遺伝子タイピングの結果、酵素欠損群と予想された患者はそれぞれ*2/*2, *2/*3 の遺伝子型を有していた 16 名であり、*3/*3 の遺伝子型は検出されなかった。出現頻度は 20% であり、従来報告されている出現頻度と同程度であった。遺伝子タイピングにおいて酵素欠損群と予想された 16 名の患者が服用している薬剤を調査した結果、CYP2C19 が代謝に関与している薬物であるジアゼパム、フェニトイン、ワーファリンを服用していた患者が 3 名いたので、それぞれについて患者の診療記録に基づき、内服薬の副作用の有無について調査

した。

症例 1: 72 歳, 女性. 病名は連合弁膜症, CYP2C19 遺伝子型は*2/*3 であった. 54 歳頃に動悸が出現し, 初めて弁膜症と診断され, 加療を続けていた. 風邪症状に引き続き呼吸困難が出現し, 秋田大学医学部附属病院に紹介入院となった. 症状が軽快後, 連合弁膜症にて日常生活に制限ありとのことで手術を受け, 約 2 ヶ月間の入院ののち経過良好にて退院となった.

症例 1 の処方内容 (Fig. 3) より, CYP2C19 の代謝への関与が考えられたのは, ジアゼパムとワーファリンの 2 剤であった. ジアゼパムは初回診察時から就寝前 2 mg の服用であり, 投与量の変動は見られなかった. ジアゼパムは CYP3A4 により主に代謝を受けるが, CYP2C19 も代謝に関与していることが報告されている.⁴⁾ CYP2C19 の酵素欠損により, CYP3A4 の代謝経路に進むと予想されるが, 2 mg と少ない量で偶然的に薬効発現, すなわち睡眠を得ていることから, 血中濃度は測定してはいないが, CYP2C19 の酵素欠損の影響で血中濃度が高くなっている可能性が示唆された. ワーファリンはラ

Prescription of the case 1

Rp) 1)	Aspirin-Dihydroxyaluminum Aminoacetate (81mg)	1T	
	Warfarin (1mg)	4T	
	Digoxin (0.25mg)	1T	
	Furosemide (20mg)	1T	1×M
2)	Diazepam (2mg)	1T	1×vds
3)	Theophylline (100mg)	2T	
	Dipyridamole (25mg)	2T	2×MA
4)	Ubidecarenone (10mg)	3T	3×1

Prescription of the case 2

Rp) 1)	Prednisolone (5mg)	12T	(6T-4T-2T)
2)	Sucralfate	3g	3×1
3)	Diazepam (2mg)	3T	3×1
4)	Ranitidine (75mg)	2T	2×MA

Prescription of the case 3

Rp) 1)	Phenytoin	180mg	2×MA
2)	Carbamazepine	300mg	2×MA

Fig. 3. Prescription of Three Patients with Expected CYP2C19 Defects

セミ体であり、CYP2C19はR体の代謝への関与が大きいことが報告されている。¹¹⁾しかしながら、R体はS体に比べ、効果が1/5と低い¹²⁾ことから、結果的にCYP2C19欠損の影響は低いものと考えられた。

症例2：16歳，女性。病名は悪性リンパ腫。CYP2C19遺伝子型は*2/*3であった。他院から紹介され秋田大学医学部附属病院にて悪性リンパ腫と診断され、診断後に化学療法を3ヵ月間施行され、退院となった。

化学療法では、シクロホスファミド、ビンクリスチン、メトトレキサートの投与を受けていた。症例2の内服薬の処方内容 (Fig. 3) より、ジアゼパムは、化学療法剤による吐き気の副作用に対して、処方されたものと考えられる。化学療法施行中、初回からジアゼパムの服用量は2 mgであり、投与量に変動は見られなかった。ジアゼパムの他にCYP2C19が代謝に関与する薬剤が処方されていなかったことから、酵素欠損による有害な副作用は、認められなかった。しかしながら、アルサルミンによるプレドニゾロンの吸収阻害という物理化学的薬物相互作用が懸念される症例であった。

症例3：37歳，男性。病名はてんかん。CYP2C19遺伝子型は*2/*3であった。15歳の時、てんかん発作をおこし、それ以来本院に外来通院している。フェニトイン、カルバマゼピンの2剤が処方されており、長期間の服用で血中濃度測定の結果に基づいて多少の薬用量の変動はあるが、この併用でコントロールされている症例である。

症例3の内服薬の処方内容 (Fig. 3) より、フェニトインの内服量が1日量180 mgと、一般的な成人量である200—300 mgに比べて低い用量であった。フェニトインの代謝の一部にCYP2C19が関与している⁶⁾ことから、酵素欠損のために通常用量より少ない量でコントロールされていると考えられた。

この調査では酵素欠損群と予想された患者において、基質薬剤の服用に関わる有害な相互作用は認められなかった。しかしながら、薬物代謝に関わる酵素などの遺伝子型検査は、その基質となる薬剤の有害な副作用の回避に役立つものと期待され、とりわけ、日本人に発現頻度の高いCYP2C19酵素欠損の予測は有用と考えられる。本研究は、医療の個別化、すなわち、テーラーメイド医療の実現のための

基礎検討として意義のある研究と考えられた。

3. うつ病患者におけるセロトニン系遺伝子多型とSSRIに対する応答性の検討¹³⁻¹⁶⁾

うつ病は脳内の神経伝達物質であるセロトニンなどの減少により発症することが知られている。¹⁷⁾セロトニン神経系に関わる遺伝子多型とSSRIの1つであるフルボキサミンの抗うつ効果との関連について検討がなされているが、SSRI薬効発現に関与する遺伝子多型はまだ特定されていない。そこで、セロトニンの生合成に関わるトリプトファン水酸化酵素 (TPH) の第7イントロン上の218番目のグアニンからアデニンへのSNP、セロトニン受容体の1つである5HT_{2A}受容体のプロモーター領域上流1438番目のグアニンからアデニンへのSNP、セロトニントランスポーター (5HTT) のプロモーター領域に存在する44塩基挿入 (L型)、欠失 (S型) 多型 (5-HTTLPR)、第2イントロン上に存在する17塩基の9, 10, 12回の繰り返しにより、それぞれ9, 10, 12型に区別されるVariable Number of Tandem Repeat (VNTR) 多型 (5-HTTVNTR)、及びセロトニンの代謝に関わるモノアミン酸化酵素 (MAOA) の第1イントロン上の30塩基の繰り返し回数 (3, 3.5, 4, 5回) により、1, 2, 3, 4型に区別されるVNTR多型 (MAOAVNTR) について解析し、各種遺伝子多型とフルボキサミン応答性との関連性について検討した。Montgomery and Åsberg Depression Rating Scale (MADRAS) スコアが20ポイント以上でうつ病診断基準によって診断された54名の単極性うつ病患者を対象とし、検討した。試験終了時において、スコアに基づく改善率が50%以上であった患者をimproved patients、50%未満であった患者をnon-improved patientsと定義した。Improved patients群は35名で平均改善度は79.1%、non-improved patients群は19名であった。Figure 4に示すようにimproved patients群とnon-improved patients群におけるTPHの遺伝子型分布では、AとCをホモ型で有する患者はnon-improved patients群に多く、ヘテロ型で有する患者はimproved patients群に多い傾向であったが、遺伝子型と改善度において有意差は認められなかった。5-HT_{2A}受容体の遺伝子型分布では、improved patients群とnon-improved patients群での遺伝子型分布は、ほぼ同様であり、遺伝子型と改善度におい

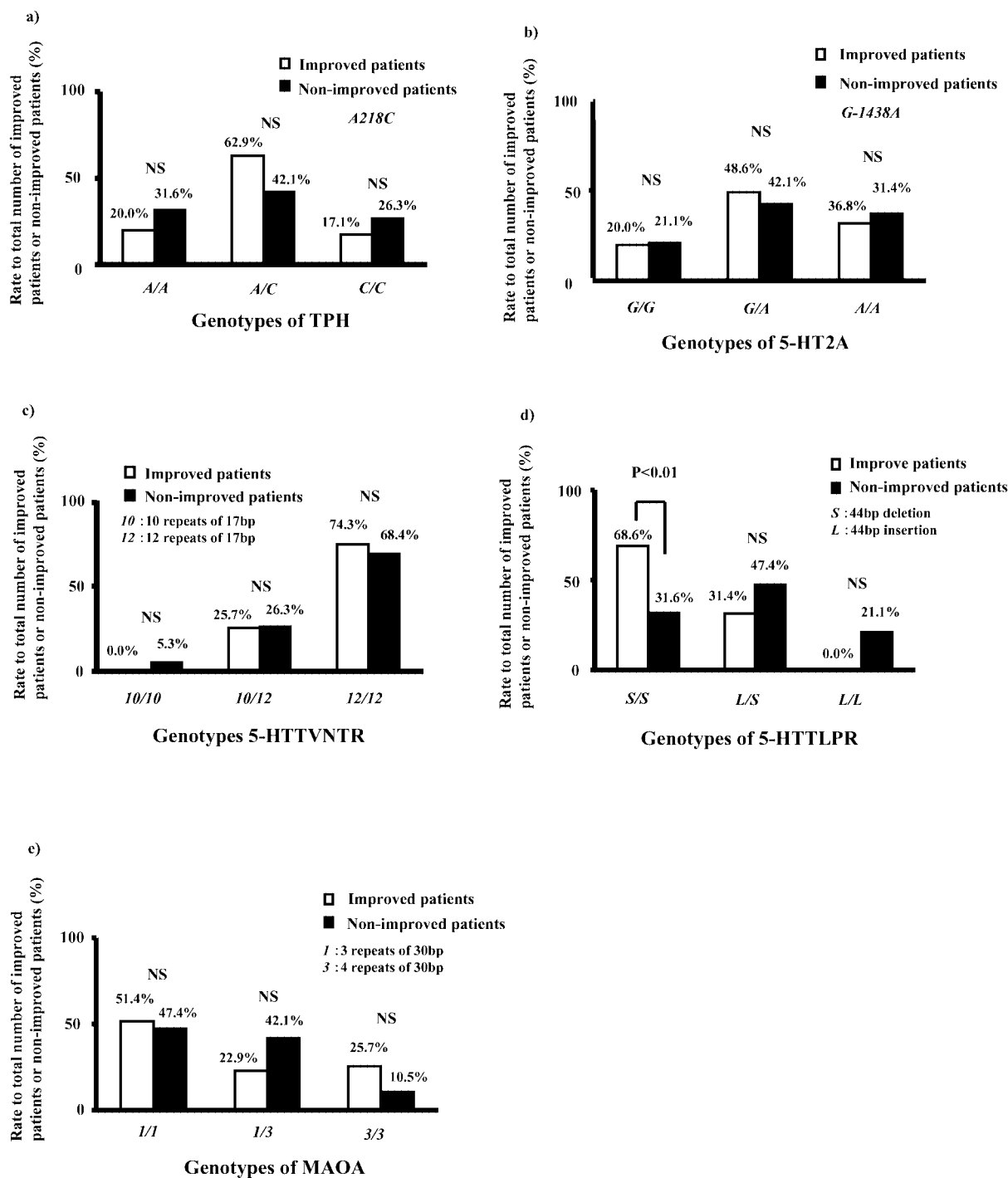


Fig. 4. Genotypes of Serotonin Transporter/Receptor/Biosynthetic or Metabolizing Enzyme in SSRI-Improved or Non-improved Patients

Distribution of genotypes of a) tryptophan hydroxylase, b) 5-HT2A receptor, c) 5HTTVNTR, d) 5-HTTLPR, e) Monoamine oxidase. Significance of difference in genotype distribution was determined by χ^2 test.

て有意差は認められなかった。5-HTTVNTR の遺伝子型分布では、improved patients, non-improved patients いずれの群においても 9 型アレルを持つ患者は検出されず、12 型アレルをホモ型で有する患者が多い傾向であったが、遺伝子型と改善度におい

て有意差は認められなかった。5-HTTLPR の遺伝子型分布では、non-improved patients 群と比較して improved patients 群において S 型アレルをホモ型で有する患者の割合が有意に高かった。MAOAVNTR の遺伝子型分布では、1 型、3 型アレルのみ検出さ

れ、I型アレルをホモ型で有する患者は、improved patients 及び non-improved patients 両群で同程度であり、3型アレルをホモ型で有する患者は improved patients 群に、ヘテロ型で有する患者は non-improved patients 群に多い傾向であったが、遺伝子型と改善度において有意差は認められなかった。以上の結果より、フルボキサミンの薬効に影響を与える因子の1つとして5-HTTLPRが考えられ、S型の対立遺伝子をホモ型で有する患者でフルボキサミンに対する応答性が高いことが示唆された。

4. おわりに

個人における薬物応答性関連タンパク活性を迅速、簡便な遺伝子タイピング法を用いて把握することにより、その個人に最適化した薬剤の選択や投与量の設定が可能になるものと期待される。私は、本研究をさらに発展させることにより、テーラーメイド医療を始めとする患者志向の医療の実現に寄与していきたいと考えている。

謝辞 本研究を行うに当たり、終始御指導、御鞭撻を賜りました秋田大学医学部附属病院薬剤部鈴木敏夫教授並びに伊藤邦彦助教授に深く感謝いたします。また、有益な御助言をいただきました秋田大学医学部附属病院精神科神経科清水徹男教授並びに吉田契造博士、岡山大学大学院薬学研究科中尾浩史助教授に深く感謝いたします。さらに本研究にご協力いただきました秋田赤十字病院薬剤部柳原せい子博士を始め秋田大学医学部附属病院薬剤部の皆様に深く感謝いたします。

なお、本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金（奨励研究）の助成により行われた。

REFERENCES

- 1) Brosen K., de Morais S. M., Meyer U. A., Goldstein J. A., *Pharmacogenetics*, **5**, 312–317 (1995).
- 2) Takakubo F., Kuwano A., Kondo I., *Pharmacogenetics*, **6**, 265–267 (1996).
- 3) Itoh K., Inoue K., Yanagiwara S., Kyoya H., Suzuki T., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 77–79 (1999).
- 4) Yasumori T., Nagata K., Yang S. K., Chen L.-S., Murayama N., Yamazoe Y., Kato R., *Pharmacogenetics*, **3**, 291–301 (1993).
- 5) Andersson T., Cederberg C., Edvardsson G., Heggelund A., Lundborg P., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **47**, 79–85 (1990).
- 6) Bajpai M., Roskos L. K., Shen D. D., Trager W. F., Levy R. H., *Pharm. Res.*, **11**, S348 (1994).
- 7) de Morais S. M., Wilkinson G. R., Blaisdell J., Meyer U. A., Nakamura K., Goldstein J. A., *Mol. Pharmacol.*, **46**, 594–598 (1994).
- 8) Ibeanu G. C., Goldstein J. A., Meyer U., Benhamou S., Bouchardy C., Dayer P., Ghanayem B. I., Blaisdell J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286**, 1490–1495 (1998).
- 9) Itoh K., Inoue K., Nakao H., Yanagiwara S., Tada H., Suzuki T., *Anal. Biochem.*, **284**, 160–162 (2000).
- 10) Yanagiwara S., Itoh K., Inoue K., Suzuki T., *Akita J. Med.*, **29**, 23–28 (2002).
- 11) Kaminsky L. S., de Morais S. M., Faletto M. B., Dunbar D. A., Goldstein J. A., *Mol. Pharmacol.*, **43**, 234–239 (1993).
- 12) Lewis R. J., Trager W. F., *J. Clin. Invest.*, **49**, 907–913 (1970).
- 13) Yoshida K., Ito K., Sato K., Takahashi H., Kamata M., Higuchi H., Shimizu T., Itoh K., Inoue K., Tezuka T., Suzuki T., Ohkubo T., Sugawara K., Otani K., *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **26**, 383–386 (2002).
- 14) Yoshida K., Naito S., Takahashi H., Sato K., Ito K., Kamata M., Higuchi H., Shimizu T., Itoh K., Inoue K., Tezuka T., Suzuki T., Ohkubo T., Sugawara K., Otani K., *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **26**, 1279–1283 (2002).
- 15) Sato K., Yoshida K., Takahashi H., Ito K., Kamata M., Higuchi H., Shimizu T., Itoh K., Inoue K., Tezuka T., Suzuki T., Ohkubo T., Sugawara K., Otani K., *Neuropsychobiology*, **46**, 136–140 (2002).
- 16) Ito K., Yoshida K., Sato K., Takahashi H., Kamata M., Higuchi H., Shimizu T., Itoh K., Inoue K., Tezuka T., Suzuki T., Ohkubo T., Sugawara K., Otani K., *Psychiatry Res.*, **111**, 235–239 (2002).
- 17) Brown R. P., Mann J. J., *Hosp. Community Psychiatry*, **36**, 141–150 (1985).