

平成21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18590545  
 研究課題名（和文） 遺伝子コピー数多型に基づく薬物動態関連遺伝子の日本人における個人差解析法の開発  
 研究課題名（英文） Development of the Analytical Methods for the Evaluation of Copy Number Variations of Drug Metabolizing Enzyme Related Genes in Japanese Population  
 研究代表者  
 石田 誠一（ISHIDA SEIICHI）  
 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長  
 研究者番号：10270505

研究成果の概要：薬物代謝酵素の活性の個人差として、従来より大規模に解析されてきた一塩基多型ではなく、研究開始当時報告された遺伝子のコピー数の多型(CNV)に注目し解析法の開発を行った。Real-time PCRによる方法では、各サンプルにつきn=4で測定することでCNVを判定できることを示した。また、GeneChipを用いると、ゲノムDNAだけでなくmRNAを用いてもCNVを検出できる可能性を示唆するデータを得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,100,000	0	1,100,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：ゲノム薬理学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：遺伝子コピー数多型、CNV、遺伝子多型、薬物動態関連遺伝子、gene dosage effect、網羅的解析、GeneChip

## 1. 研究開始当初の背景

薬物動態に係る酵素遺伝子の個人差の解析は、薬物の投与計画のテーラーメイド化を目標に、一塩基多型を中心に精力的に行われてきた。その結果多数の一塩基多型が報告されてきたが、未だに薬物代謝活性の個人差を十分に説明しうる状況に至っていない。たとえば最も多種の薬物の代謝に関与するとされるCYP3A4は、機能に影響を及ぼす一塩基多型の出現頻度は非常に低く(各2.5%以下)、また、遺伝子配列上では野生型の遺伝子を持つとされるヒト由来の初代培養肝細胞を用いた酵素活性の検討でも、個人間で代謝活性の大きな差が存在することが判明

してきている(例えば、山崎浩史. ヒトチトクロムP450の薬物代謝学・毒性学的研究. 薬学雑誌. 2000;120(12):1347-57)。さらに、その発現制御領域やそこに結合し発現を調節すると考えられている核内受容体においても、機能に影響を及ぼす一塩基多型の頻度は非常に低い(各1%以下)。以上の知見は、従来行われてきた一塩基多型中心の解析では、個人差の説明には不十分であることを示している。一方、最近になり、ヒト染色体の局所的コピー数の網羅的解析により、健康人の中でも、従来の予想をはるかに超えた頻度と領域でゲノムのコピー数が増加していることがHarvard Medical School, C. Leeの

グループ及び Cold Spring Harbor Laboratory, M. Wigler のグループにより相次いで報告された(遺伝子コピー数多型: CNV, Iafrate *et al.* Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat. Genetics* 2004;36(9):949-51; Sebat *et al.* Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004; 305 (5683): 525-28)。遺伝子の発現量は、コピー数に基づく **gene dosage effect** が知られており、欠損によりコピー数が半減するだけでも発現量の 50 % の低下が起こる。このような事象が、薬物代謝酵素遺伝子自身及びその転写調節因子で起こると、総和として、生体由来試料で観察されるような個人差に結びつく遺伝子発現量の変動をもたらす可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、薬物代謝酵素やその転写調節因子である核内受容体 *PXR*, *CAR* などの遺伝子のコピー数の個人差に注目する。薬物代謝酵素 *CYP2D6* や *glutathione S-transferase* では、遺伝子の重複によるコピー数の変化とそれに伴う代謝能の変化が報告されているが、それ以外の特定の薬物動態に関連する遺伝子に着目し、染色体数の局所的不均衡に基づくコピー数の変化を検討した例は報告がない。本研究課題では、まず、ヒトにおいて薬物動態に関係する酵素遺伝子及びその転写を制御すると考えられている遺伝子のゲノム上のコピー数を簡便に測定する系を確立する。さらに、確立した方法を用い、日本人由来のヒト不死化 B 細胞 DNA について、それらのコピー数に個人差があるかを検証し、より大規模な解析に向けた基礎検討を行う。日本人由来のヒト不死化 B 細胞 DNA には、ファルマコスニップスコンソーシアムにおいて樹立された不死化 B 細胞由来の DNA を 100 検体用いる。Lee ら及び Wigler らの報告によれば 10%以上の頻度で見出される局所的な染色体数の不均衡も報告されているので、本研究課題での基礎検討でも個人差を説明できるだけのコピー数の変化が見出される可能性がある。さらに、日本人由来の試料を中心に行うため、一塩基多型の解析で見られたように、日本人固有の変化が見出される可能性がある。一塩基多型の解析と同様に、将来的には多数のボランティアにより提供されたサンプルの解析が必須であるが、本研究はその際の基礎を提供するものであり、テーラーメイド医療の実現に向けて重要なものである。

また、研究期間内において、上記研究と平行して、ヒト骨髄性白血病細胞 HL-60 より得た RNA を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果を詳細に再検討し、染色体コピー数の局所的不均衡が疑われる新たな染色体領域を、

**gene dosage effect** に基づき同定することを試みる。その領域に含まれる遺伝子の検討により、個人差を説明する新規因子が見出される可能性がある。見出された新規因子に関しては、上記研究の成果を応用し、コピー数を測定する系を確立する。

## 3. 研究の方法

### 試料

ヒトゲノム DNA は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより日本人由来ヒト不死化 B 細胞ゲノム DNA 100 サンプルを購入した。ドナーの構成は 20, 30, 40, 50, 60 歳代の日本人男女各 10 ドナーずつ、計 100 ドナーである。当該サンプルの購入に必要な当所倫理委員会の承認は平成 17 年 2 月に取得済みである。

### (1) 薬物動態関連遺伝子 CNV データベースの整備

The Centre for Applied Genomics (Canada, Toronto) の運営する Database of Genome Variants により、薬物動態に関連する遺伝子を対象に CNV の存在の有無の検索を実施し、CNV が存在した遺伝子については CNV の情報を抽出しデータベース化した (ヒュービットジェノミクス社に委託)。

### (2) CNV 検出用 TaqMan プロブを用いた CNV の測定

CNV 検出用の TaqMan プロブは発現解析用プロブの作成と同様の条件で、イントロン配列を中心に設計した。CNV の測定は、発現解析と同じ定法に従い、各サンプルにつきゲノム DNA 10 ng を用いて行った。サンプルのドナーの構成は 20 歳代男女、30 歳代男女、40 歳代男女、50 歳代男女、60 歳代男女各 10 ドナー(計 90 サンプル)とした。具体的には、*RNaseP* 遺伝子を内部標準とし、検出用 TaqMan プロブとの duplex real-time PCR を各サンプル n=4 で行い Ct 値を求め、 $\Delta\Delta Ct$  法により各遺伝子と *RNaseP* 遺伝子の存在比を算出した。その後、real-time PCR を行ったプレート毎のサンプルの存在比の中央値を算出し、その値を遺伝子コピー数=2 とし各サンプルのコピー数を算出した。各遺伝子について全 90 サンプルの平均値と標準偏差(SD)を求め、平均 $\pm$ 3 SD を超えるサンプルを CNV を示すサンプルとした。

### (3) HL-60 細胞亜株におけるゲノムコピー数の比較解析

Affymetrix 社より入手したゲノム DNA 標識法を用い、遺伝子発現用 GeneChip(Human Genome U95A)をコピー数測定に転用した。対象としては、既に核型解析により染色体数が異なっていることを

確認してある HL-60 細胞亜株二株を用いた。プロトコルに従いコピー数を測定した後、Microarray Suite Expression Analysis software (MAS version 5.0, Affymetrix)で数値化した。得られた測定値は Stanford 大が開発した CGH-Miner により解析した。

染色体コピー数の局所的不均衡が疑われる染色体領域を、gene dosage effect に基づき同定するために、ゲノム DNA の測定に用いたのと同じ解析手法をすでに取得済みである HL-60 細胞亜株 2 株の定常増殖期にある細胞から得た RNA による遺伝子発現データに適用した。発現データは各細胞株に関して n=6 で測定した結果を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 薬物動態関連遺伝子 CNV データベースの整備

薬物動態関連遺伝子を対象に、The Centre for Applied Genomics (Canada, Toronto) の運営する Database of Genome Variants データベースで CNV の存在の有無の検索を実施した(ヒュービットジェノミクス株式会社に委託)。その結果、対象とした薬物動態関連遺伝子 238 遺伝子のうち 63 遺伝子において 109 個の CNV が見出された。CNV の存在頻度は各 CNV によって異なり、1%以下のものから 10%を超えるものまで存在した。

##### (2) CNV 検出用 TaqMan プローブを用いた CNV の測定

(1)のデータベースにおいて CNV が認められた 10 種の遺伝子について、TaqMan Chemistry に基づき検出用プローブを設計し、作成した。その検出用プローブを用いて、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した日本人由来ヒト不死化 B 細胞ゲノム DNA 90 サンプルを対象にコピー数を real-time PCR により測定した。サンプルのドナーの構成は 20 歳代男女、30 歳代男女、40 歳代男女、50 歳代男女、60 歳代男女各 10 ドナー(計 90 サンプル)とした。RNase P 遺伝子を内部標準としてコピー数 = 2 と仮定し、各サンプルの遺伝子数を  $\Delta \Delta Ct$  法で算出した。全 90 サンプルの平均値と標準偏差 (SD)を求め、平均値  $\pm 3SD$  を超えるサンプルを CNV を示すサンプルとした。図 1 に多くの薬物動態関連遺伝子の発現調節をすることが知られている核内受容体 *PXR* の測定結果を代表例として示す。この場合、対象とした 90 サンプルの中で、平均値から 3SD を超えるサンプルは存在しなかった。今回 TaqMan プローブを設計した 10 遺伝子について同様に測定し、CNV と思われるサンプルが存在したものは、*CYP2A7* と *CYP2B6* のみであった。

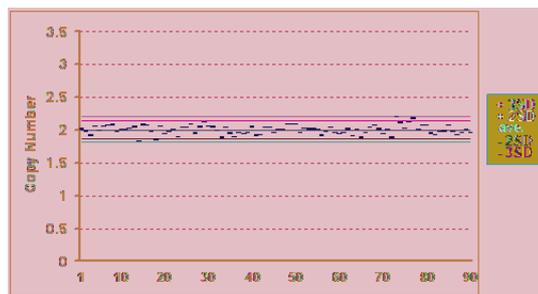


図 1 核内受容体 *PXR* のコピー数解析の結果

そこで、次に、この二つの CNV の認められた遺伝子の測定結果について、再現性を確認するため、一回目と同じ条件でサンプル数を 24 サンプルに減らして測定した。その結果 *CYP2A7* でのみ再現性が確認された。結果を図 2 に示す。

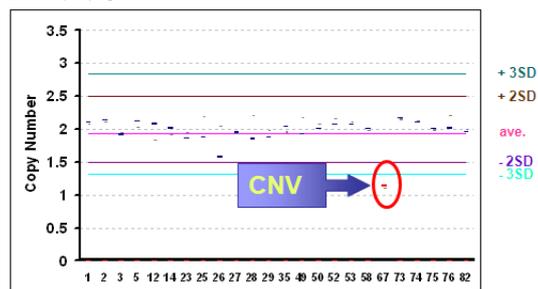


図 2 *CYP2A7* の再測定結果

—:一回目 —:二回目

*CYP2A7* では選んだ 24 サンプル全般でほぼ同じコピー数の測定値を与えていたが、*CYP2B6* ではばらつきがあり、二回目の測定では CNV は認められなかった。(データ示さず)。

*CYP2A7* は、*CYP2A7* を中心にゲノム上約 150Kbp の領域で *CYP2A6* と *CYP2B6* に挟まれて存在している。今回図 2 で CNV の存在が確認されたサンプルについて、それぞれの遺伝子のコピー数を確認したところ、*CYP2A6*、*CYP2B6* は 2 コピーであった。このことは *CYP2A7* を中心とした領域でコピー数が 1 に減少する CNV が存在していることを示唆しており、今回の方法で CNV の測定が可能であることを示している。

一回目の測定において多くの遺伝子は図 1 に示した程度のばらつきの測定値を示したが、ばらつきが大きい遺伝子も存在した。その例を図 3 に示す。

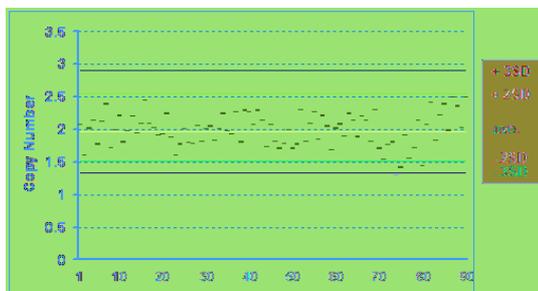


図 3 サンプル間でばらつきが大きかった測定例

この遺伝子について、real-time PCR の増幅曲線を確認すると、通常得られるシグモイドカーブと比較してばらつきや増幅率が劣ることがわかった。内部標準として用いている *RNaseP* も同じ傾向を示していたことから、PCR 反応時において、二つの遺伝子の PCR プライマーが共存すると、PCR 産物の増幅を干渉しあうことが疑われた。そこで、Applied Biosystems 社より新たに発売された 2XPCR master mix (cat. no. 4369016) を用いて再度測定を行った。この 2XPCR master mix は multiplex PCR 時のプライマーの相互干渉が起こりにくいよう反応液の組成が工夫されているものである。その結果、real-time PCR の増幅曲線が改善され、測定値も図 4 に示すように測定値のばらつきの減少が確認され、2XPCR master mix の変更が効果的であることが示された。

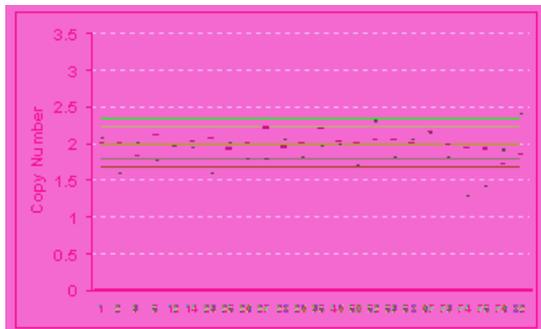


図 4 図 3 のサンプルの新規 2XPCR master mix を用いた再測定

### (3) HL-60 細胞亜株におけるゲノムコピー数の比較解析

染色体コピー数の局所的な不均衡が疑われる新たな染色体領域を、gene dosage effect に基づき同定することが可能かを検討するため、すでに取得済みである HL-60 細胞亜株 2 種の発現データ (それぞれにつき n=6) を再度解析した。

解析を始めるにあたり、まず上記の発現解析で用いたのと同じの GeneChip (Human Genome U95A) を用いて、遺伝子のコピー数を網羅的に解析する方法の検討を行った。Affymetrix 社より入手したゲノム DNA を標識する方法を用いそれぞれの細胞株から得たゲノム DNA を標識した。その後、Affymetrix 社の提供するプロトコールに従い GeneChip にハイブリダイゼーションし、洗浄後スキャナーにてシグナル値を測定し、得られた測定値は Microarray Suite Expression Analysis software (MAS version 5.0, Affymetrix) にて数値化した。得られた測定値は Stanford 大が開発した CGH-Miner により解析した。解析結果を図 5 に示す。

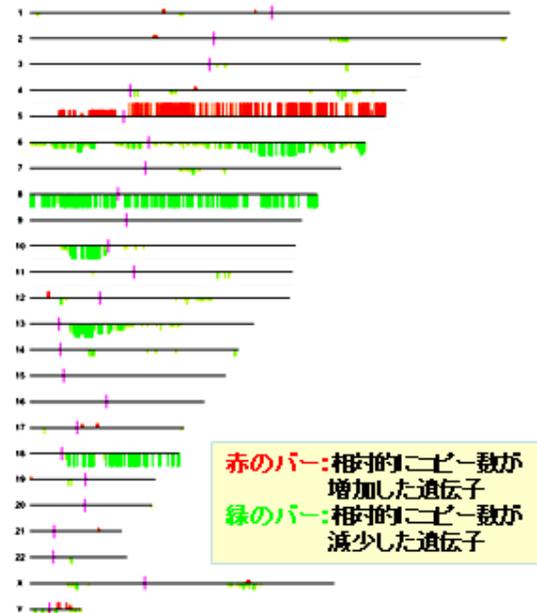


図 5 GeneChip による HL-60 細胞亜株の遺伝子コピー数の測定結果

染色体 5 番、8 番、13 番、18 番などで核型解析と一致する結果を得た。その一方、6 番染色体のように核型解析の結果とは異なるコピー数を一定の領域にわたって与える場合も認められた。核型解析とアレイを用いたコピー数解析との乖離については今後詳しい検討が必要である。

次に、すでに取得済みの HL-60 細胞亜株 2 株の定常増殖期にある細胞から得た RNA による網羅的遺伝子発現データ (n=6) を遺伝子コピー数を解析したのと同様に CGH-Miner により解析した。

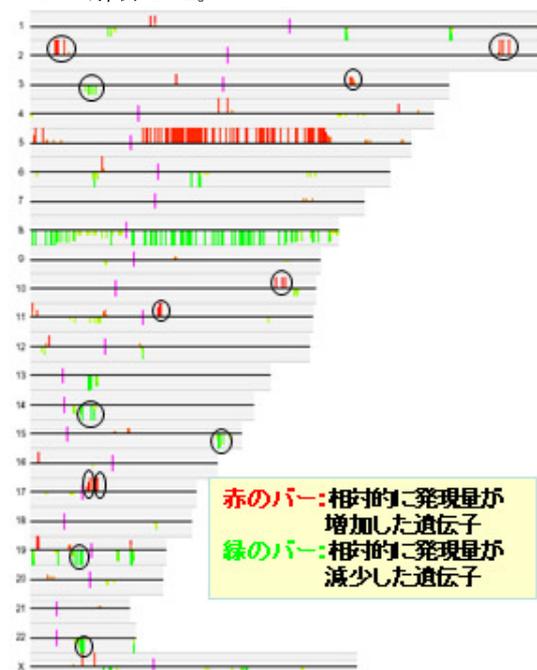


図 6 HL-60 細胞亜株間で遺伝子発現が有意に変化している領域

その結果、亜株2細胞間で発現が有意に変化しているゲノム領域を見出した。結果を図6に示す。

図6で得られた結果を図5の遺伝子コピー数の測定結果と比較すると、染色体5番や8番などでgene dosage effectにより発現が変化している領域が確認された。この結果は遺伝子発現データからも、ゲノム上の遺伝子コピー数が変化している領域の推定が可能であることを示唆していた。

その一方で、図6中○で囲った領域は、亜株間で遺伝子のコピー数が変化していないにもかかわらず、ゲノム上の一定領域において発現量が増加している領域である。この領域には複数の遺伝子が含まれており、それらの遺伝子の発現調節において、転写因子などの既知の共通の転写調節因子は認められなかった。このことは、既存の転写調節機構ではないもので、ゲノム上の広い領域にわたる遺伝子の発現を一括して調節する新規の機構が存在することを示唆しており、今後はその機構の解明が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

- ① Ishida S, Tanabe H, Sawada JI, Ozawa S, Nakazawa K.  
Analysis of Copy Number Variations (CNVs) of Drug Metabolizing Enzyme Related Genes in Japanese, 8th International ISSX Meeting(2007, 10/9; Sendai)

[図書] (計2件)

- ① Ishida S, Tanabe H, Shinozaki Y, Koyano S, Kagechika H, Shudo K, Ozawa S, Sawada JI, Ohno Y, Inoue K.  
How DNA microarray technology contributes to the retinoid evaluations. In "Vitamin A: New Research" (Ed. Loessing IT.) Nova Scientific Publishers, Inc. 2007, 71-92.
- ② 田辺秀之 II. 実践編 1章 (2)「FISH法」  
In "実験がうまくいく蛍光・発光試薬の選び方と使い方" (三輪佳宏 編) 羊土社 2007, 50-55.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石田 誠一 (ISHIDA SEIICHI)

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長

研究者番号：10270505

##### (2) 研究分担者 (2006年度、2007年度)

小澤 正吾 (OZAWA SHOGO)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：20185581

田辺 秀之 (TANABE HIDEYUKI)

総合研究大学院大学・先端科学研究科・准教授

研究者番号：50261178

(3) 連携研究者 (2008年度)

小澤 正吾 (OZAWA SHOGO)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：20185581

田辺 秀之 (TANABE HIDEYUKI)

総合研究大学院大学・先端科学研究科・准教授

研究者番号：50261178