

機関番号：17102  
 研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20390160  
 研究課題名 (和文) 硝酸薬の血管拡張作用に及ぼす ALDH2 遺伝子多型の影響に関する薬理遺伝学的研究  
 研究課題名 (英文) Pharmacogenetic studies on the influence of ALDH2 gene polymorphisms on the vasodilation induced by organic nitrates  
 研究代表者  
 笹栗 俊之 (SASAGURI TOSHIYUKI)  
 九州大学・大学院医学研究院・教授  
 研究者番号：30261209

研究成果の概要 (和文) : ニトログリセリン (GTN) の活性化に 2 型アルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) が関与するとされているが、487 番アミノ酸の 1 塩基多型により ALDH2 活性には著しい個人差がある (\*1/\*1 : 高活性、\*1/\*2 : 低活性、\*2/\*2 : 無活性)。この多型が GTN の血管拡張効果に及ぼす影響を解明するとともに二硝酸イソソルビド (ISDN) と比較するため、GTN または ISDN を投与し、上腕動脈径を連続測定するクロスオーバー試験を実施した。GTN 投与後の最大拡張率には遺伝子型による差はなかったが、拡張に要した時間は \*1/\*1 に比べて \*1/\*2 と \*2/\*2 では有意に長かった。一方 ISDN では遺伝子型による差はなかった。また、\*1/\*1 と \*1/\*2 では ISDN より GTN の方が速く拡張させたが、\*2/\*2 では速度に差はなかった。以上より、\*1/\*2 と \*2/\*2 では GTN による血管拡張が有意に遅れること、\*2/\*2 では GTN と ISDN の効果に差がないことがわかった。

研究成果の概要 (英文) : To examine whether polymorphisms at codon 487 of aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) influence nitroglycerin (GTN)-induced vasodilation, and whether GTN or isosorbide dinitrate (ISDN) is more effective in each genotype, we performed a crossover trial using sublingual spray of GTN and ISDN. Maximal artery diameter increase in response to GTN or ISDN did not differ among genotypes. However, the time required for dilation was longer in the \*1/\*2 and \*2/\*2 genotypes than \*1/\*1. In contrast, ISDN-induced dilation did not differ among genotypes. The time required for GTN dilation was shorter than that for ISDN dilation among \*1 allele carriers, whereas GTN and ISDN dilation did not differ among participants carrying \*2/\*2. These results suggested that the response to GTN was significantly delayed in \*2 allele carriers. GTN dilated the artery more quickly than ISDN in \*1/\*1 and \*1/\*2, but not in \*2/\*2.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：臨床薬理学、循環器病学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：硝酸薬、ニトログリセリン、二硝酸イソソルビド、狭心症、血管拡張、2 型アルデヒド脱水素酵素、遺伝子多型、ゲノム薬理学

## 1. 研究開始当初の背景

ニトログリセリン (三硝酸グリセリン、GTN) は、狭心症の第 1 選択薬として広く用

いられている。GTN はプロドラッグであり、体内で還元代謝されることによって生じた NO が血管平滑筋を弛緩させると考えられて

いる。

GTNを還元する酵素としては、従来、グルタチオンS-転移酵素やチトクロムP450などが候補とされてきたが、明らかではなかった。2002年、ChenらはGTNの還元代謝活性を有する蛋白質を精製し、それがミトコンドリアのALDH2であることを発見した(Chen et al. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 8306-11)。以来、GTNの還元におけるALDH2の役割が注目されるようになった。GTNの還元がALDH2によることは、ALDH2ノックアウトマウスを用いた実験でも確認された(Chen et al. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 12159-64)。

ALDH2の活性には、487番アミノ酸の一塩基多型(\*1: GAA=Glu, \*2: AAA=Lys)により、著しい個人差が存在することがよく知られている。欧米白人は、ほとんど全て高活性のGlu<sup>487</sup>/Glu<sup>487</sup>ホモ接合体(\*1/\*1)なのに対し、日本人を含む東アジア人では\*1/\*1は60~70%に過ぎず、30~40%が低活性のGlu<sup>487</sup>/Lys<sup>487</sup>ヘテロ接合体(\*1/\*2)、3~5%がほとんど無活性のLys<sup>487</sup>/Lys<sup>487</sup>ホモ接合体(\*2/\*2)である。

Mackenzieらは、12名の健常者を対象に、ALDH2阻害薬ジスルフィラムの投与前後でGTNを動注し、プレチスモグラフィで前腕血流量を測定し、投与後の効果が33%減弱することを認めた。また、\*2アレルを有する11名の東アジア人を対象にGTNの効果を見たところ、\*1/\*1に比べて前腕血流量が40%低下した(Mackenzie et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25: 1891-5)。

しかしながら日本人に関する調査報告はなく、その上、Mackenzieらの調査対象の大部分は\*1/\*2であり、日本人で3~5%を占める\*2/\*2においてGTNの薬効がどの程度低下するかについては全くデータがない。すなわち、日本人の狭心症患者についてALDH2の遺伝子多型をどの程度考慮しなければならぬか、\*1/\*2や\*2/\*2の患者にもGTNを第1選択薬とするべきなのか、GTNではなく他の硝酸薬を処方すべきなのか、判断の根拠を示す臨床試験は行われていない。

GTNの代替薬としては二硝酸イソソルビド(isosorbide dinitrate: ISDN)があり、舌下錠や口腔内スプレーも開発され、狭心痛に対する急性効果が認められている。これまでの基礎研究では、ALDH2はイソソルビド化合物のNO遊離には関与しないとされている。それならば、ISDNの投与はALDH2の多型に関わらず効果をもたらすと考えられる。

以上の観点から、GTNの効果はALDH2の多型によりどれほど異なるのか、各多型においてISDNとGTNではどちらが優れるかを明らかにし、ALDH2多型を考慮した硝酸薬選択のエビデンスを築くため、精度が高くバイアスの小さい臨床試験を行う必要があると思わ

れた。

## 2. 研究の目的

GTNもしくはISDNを投与した後の血管拡張反応とALDH2遺伝子多型との関係を明らかにすることにより、狭心症に対する硝酸薬の適正使用に関する情報を得る。(当初は、さらに、GTN、ISDN、およびそれらの代謝産物の血中濃度を測定することにより、ALDH2による還元代謝との関連を裏付けることも第2の目的として予定していたが、進行が遅れたため、この目的は期間内には果たせなかった。)

## 3. 研究の方法

当初の計画では、健常人を対象として、次の2つの臨床試験を実施する予定であった。

### ① 薬効試験

GTNもしくはISDNを投与した後、上腕動脈径の変化を超音波断層法で測定する。静脈血からDNAを抽出してALDH2の遺伝子型を決定し、血管拡張反応との関連を解析する。

### ② 薬物動態試験

ALDH2遺伝子多型別にGTNおよびISDNの薬物動態を比較する。

しかしながら、進行の遅れにより、研究期間内には①の薬効試験しか実施できなかった。以下は、薬効試験についてのみ記す。

### (1) 対象者

#### ① 選択基準

20歳以上40歳未満の健康な成人。性別を問わない。

#### ② 除外基準

- 治療を要する疾患を有する者
- 薬物治療中の者
- 循環器疾患の既往を有する者
- 重篤な肝障害を有する者
- 重篤な腎障害を有する者
- 妊娠中の者
- 有機硝酸薬による副作用の既往のある者
- ホスホジエステラーゼ-5阻害薬使用中の者
- 収縮期血圧<90 mmHgの者
- 体重<40 kgの者
- 研究責任者が不適当と判断した者

### (2) 実施手順

- ① 静脈血または唾液よりDNAを抽出し、ALDH2の487番アミノ酸多型部位をPCRで増幅し、制限酵素(*TspRI*)切断部位の有無により遺伝子型を決定する。
- ② 無作為にGTN先行群またはISDN先行群に割り付ける。
- ③ GTN(0.3 mg、ミオコールスプレー、トーアエイヨー)または、ISDN(1.25 mg、ニトロールス

- プレー、エーザイ)を舌下噴霧する。
- ④ 投与前 15、10、5 分、投与後 5、10、15 分で、安静臥位にて脈拍数と血圧を自動血圧計(上腕測定式)にて測定し、記録する。
  - ⑤ 被験者の遺伝子型を知らない測定者が、硝酸薬投与前 30 秒から投与後 10 分までの上腕動脈径を、超音波断層装置(UNEX EF 18G II、UNEX Corporation)を用いて、連続的に計測する。
  - ⑥ 1 週間以上間を空けた後、薬を交換して、同様の試験を繰り返す(クロスオーバー法)。
  - ⑦ 遺伝子多型と血管拡張反応の関連を解析する。

### (3) 評価項目

- ① 一次評価項目
  - 上腕動脈径の変化率
  - 最大拡張に要する時間
  - 90%最大拡張に要する時間
- ② 二次評価項目
  - 脈拍数・血圧の変化率

## 4. 研究成果

### (1) 遺伝子解析と被験者選択

305 人の ALDH2 遺伝子多型を解析した(\*1/\*1: 156 人、\*1/\*2: 111 人、\*2/\*2: 38 人)。このうち 117 人(\*1/\*1: 47 人、\*1/\*2: 48 人、\*2/\*2: 22 人)を対象者として、臨床試験を実施した。遺伝子型間で、男女比、年齢、身長、体重、BMI、脈拍数、収縮期血圧、拡張期血圧に有意な差はなかった。

### (2) 最大血管拡張率

GTN による最大拡張率は、\*1/\*1: 17.6% (16.3-19.6%)、\*1/\*2: 19.5% (17.7-21.0%)、\*2/\*2: 19.6% (17.2-22.1%)、ISDN による最大拡張率は、\*1/\*1: 18.3% (16.9-19.9%)、\*1/\*2: 18.9% (17.4-20.4%)、\*2/\*2: 18.9% (16.7-21.0%) であり、遺伝子型間で有意差を認めなかった(括弧内は 95%信頼区間)。したがって、GTN も ISDN も、最終的な血管拡張率には遺伝子型による差はないことが明らかとなった。

### (3) 拡張に要する時間

しかし、最大径に到達するのに要した時間は、\*1/\*1: 254.7 秒 (236.8-273.4)、\*1/\*2: 277.4 秒 (259.4-294.3)、\*2/\*2: 299.7 (269.0-330.4) であり、\*1/\*1 に比べて\*2/\*2 では有意に延長していた (P=0.0190)。さらに、最大径の 90%に到達するのに要した時間は、\*1/\*1: 174.9 秒 (161.5-188.3)、\*1/\*2: 206.1 秒 (191.7-219.3)、\*2/\*2: 231.4 秒 (211.8-251.0) であり、\*1/\*1 に比べて\*1/\*2 (P=0.0068) と\*2/\*2 (P<0.0001) では有意に延長していた。

一方、ISDN では、いずれのパラメーターにも遺伝子型による差を認めなかった。

### (4) GTN と ISDN の比較

次に、各遺伝子型において、どちらの硝酸薬がより効果的かを解析した。

硝酸薬投与後の最大血管拡張率には GTN と ISDN の間に差はなかった。

一方、最大径に到達するのに要した時間で見ると、\*1/\*1 と\*1/\*2 では、ISDN より GTN の方が速く血管を拡張させたが(ともに P<0.0001)、\*2/\*2 では速度に差は認めなかった (P=0.0972)。また、最大径の 90%に到達するのに要した時間で見ても、やはり、\*1/\*1 と\*1/\*2 では GTN の方が速く(それぞれ P<0.0001、P=0.0039)、\*2/\*2 では GTN と ISDN に差を認めなかった (P=0.1996)。

### (5) 考察

予期に反して、GTN 投与後の最大血管拡張率には遺伝子型による差は認められなかったが、\*1/\*2 と\*2/\*2 では、GTN の血管拡張反応が有意に遅れることが明らかとなった。最大拡張の 90%に到達するまでの時間で見ると、\*1/\*1 と比較して\*2/\*2 には約 1 分の遅れが見られた。これは、できるだけ速やかに狭心痛を除くという GTN の使用目的から見て、有意な遅延ではないかと考えられた。

また、\*2/\*2 では、GTN と ISDN の効果発現速度に差がなかったため、\*2/\*2 においては ISDN も第 1 選択薬となり得ることが示された。

ALDH2 の遺伝子多型は GTN の効果発現速度に影響を与え、硝酸薬選択の指標となる可能性があるため、治療前に ALDH2 の遺伝子型を知ることは個別化医療を実践する上で有用ではないかと考えられた。

ただし、GTN の効果発現速度の差が、本当に ALDH2 による還元代謝速度の差によるのかどうかは、今回実施した薬効試験ではわからない。もともとは、GTN の薬物動態を多型別に調査する試験も続けて行う予定であったが、\*2/\*2 の募集に予想以上の時間がかかったことなどにより進行が遅れ、期間内に終了させることができなかった。今後、引き続き実施する予定である。

## 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Sakata S, Yoshihara T, Arima H, Shiraishi F, Oniki H, Takahashi-Yanaga F, Matsumura K, Sasaguri T. Differential effects of organic nitrates on arterial diameter among healthy Japanese participants with

different mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 genotypes: randomised crossover trial. BMJ Open 2011, in press.

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 吉原達也, 坂田智子, 白石富美恵, 鬼木秀幸, 市島久仁彦, 大坪俊夫, 三輪宜一, 高橋富美, 有馬久富, 松村潔, 笹栗俊之. 2型アルデヒド脱水素酵素の遺伝子多型がニトログリセリンおよび二硝酸イソソルビドの血管拡張作用に及ぼす効果. 第31回日本臨床薬理学会年会, 京都, 2010年12月1-3日
- ② 笹栗俊之, 坂田智子, 吉原達也, 白石富美恵, 松村潔. ALDH2の遺伝子多型がニトログリセリンの薬効に及ぼす影響. 第20回日本循環薬理学会年会, 札幌, 2010年11月11-12日
- ③ 坂田智子, 松村潔, 三輪宜一, 鬼木秀幸, 市島久仁彦, 吉原達也, 高橋富美, 白石富美恵, 大坪俊夫, 笹栗俊之. 2型アルデヒド脱水素酵素の遺伝子多型がニトログリセリンおよび二硝酸イソソルビドの血管拡張作用に及ぼす影響. 第33回日本高血圧学会年会, 福岡, 2010年10月15-17日
- ④ Sakata S, Matsumura K, Miwa Y, Oniki H, Ichishima K, Arima H, Takahashi-Yanaga F, Yoshihara T, Shiraishi F, Iida M, Sasaguri T. Effect of aldehyde dehydrogenase-2 gene polymorphism on vasodilatory response of brachial artery induced by nitroglycerin. 23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, バンクーバー, 2010年9月26-30日
- ⑤ Sakata S, Ichijima K, Oniki H, Miwa Y, Arima H, Matsumura K, Yoshihara T, Takahashi-Yanaga F, Shiraishi F, Sasaguri T. Influence of aldehyde dehydrogenase-2 gene polymorphism on vasodilatation induced by organic nitrates in healthy human subjects. WorldPharma 2010, コペンハーゲン, 2010年7月17-23日

〔図書〕（計 1 件）

- ① 笹栗俊之、抗狭心症薬、南江堂、NEW 薬理学（改訂第 6 版）、2011、395-399

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹栗 俊之 (SASAGURI TOSHIYUKI)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：30261209

(2) 研究分担者

高橋 富美 (TAKAHASHI FUMI)  
九州大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：50274436  
松村 潔 (MATSUMURA KIYOSHI)  
九州大学・病院・助教  
研究者番号：70285469