

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390164

研究課題名（和文）個別化医療の実現を目指した新規迅速遺伝子解析技術の臨床応用

研究課題名（英文）Clinical application of a novel rapid gene analyzing method aiming at personalized medicine

研究代表者

村上 正巳（MURAKAMI MASAMI）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30241871

研究成果の概要（和文）：個別化医療の実現を目指し、新規迅速遺伝子解析技術である Smart Amplification Process 法を用いてワルファリン投与患者における薬物代謝に関わる酵素の遺伝子の一塩基多型ならびに糖尿病や肥満の患者におけるエネルギー代謝に関係するタンパクの遺伝子の一塩基多型を解析した。

研究成果の概要（英文）：In order to introduce personalized medicine, single nucleotide polymorphism of drug metabolizing enzymes in the warfarin treated patients and energy metabolism related proteins in the patients with diabetes and obesity using a novel rapid gene analyzing technique, the Smart Amplification Process.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	11,900,000	3,570,000	15,470,000

研究分野：遺伝子検査

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、一塩基多型、糖尿病、肥満、薬剤反応性

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子の一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism, SNP）は、肥満やメタボリック症候群、糖尿病、高脂血症、高血圧などの生活習慣病との関連や、治療に使われるさまざまな薬物の代謝との関連が明らかになってきている。SNPの情報をもとにして、食事指導や運動指導を行い、また、薬剤の副作用や効果の個人差から適切な薬物の投与量を推定して、個人々々により適した医療を提供する個別化（オーダーメイド）医

療の実現にあたっては、簡便で正確な遺伝子検査の実施が求められているが、その迅速性、簡便性、正確性、価格など一般の臨床の現場が十分に満足して使用できるまでに至っておらず、核酸の抽出、増幅、検出と多岐に渡るステップに分かれているので、専用の装置や熟練した人員を必要とした。そのため、個別化医療を臨床現場に導入することは難しく、その利用は一部のごく限られた範囲にとどまっているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、個別化医療の実施と普及を目指して、その実現に最適と考えられる簡便、迅速、正確な遺伝子の SNP の検出方法を開発し、実際の医療の現場でその検査方法を利用して遺伝子検査を実施し、個別化医療推進の一助とすることを目的とする。

3. 研究の方法

理化学研究所ゲノム科学総合研究センター遺伝子構造・機能研究グループ（林崎良英ディレクター）では、安価、簡易、迅速な新規等温核酸増幅法である SmartAmp (Smart Amplification Process) 法を開発し、研究代表者も共同研究者として検討を行い、成果は Nature Methods 誌 (4:257-262, 2007) に掲載された。SmartAmp 法は、目標とする遺伝子多型を、核酸抽出の手順を踏むことなく、血液などの臨床サンプルから直接に、30 分という短時間で検出することができる個別化医療実現の一助となる画期的な方法であり、以下のような特長を持つ。

- ① 1 つの系内で 1 ステップの増幅反応、検出を行うため、非常に簡便である。
- ② 60°C 付近の等温条件下で反応が進行するため、PCR の必要がなく、装置の小型化、簡素化が可能であり、消費エネルギーも少なく済む。
- ③ 高い増幅効率により、血液や組織から 30 分以内に SNP を検出することが可能である。
- ④ ターゲットとなる遺伝子に対して 5 本のプライマーを設計し、遺伝子上の 6 つの領域を認識して増幅し、バックグラウンドを抑制するタンパク質 (MutS) を使用することにより特異性を高めている。
- ⑤ 遺伝子増幅に使用する酵素が阻害物質に強いいため、PCR では増幅が難しい血液や組織から直接遺伝子を増幅することが可能である。

SmartAmp 法においては、非対称的なプライマーを設計することで、増幅と同時にタイピングを行うことが可能であり、遺伝子上の SNP や欠失を極めて特異的に検出することができる。

本研究では、薬物代謝酵素として、抗てんかん薬のフェニトイン、抗凝固薬のワルファリンなどの代謝に関与する CYP2C9、抗潰瘍薬であるプロトンポンプ阻害薬のオメプラゾール、催眠鎮痛薬のジアゼパム、抗てんかん薬のフェニトイン、抗うつ薬のイミプラミンなど多くの薬剤の代謝に関与する CYP2C19、抗結核薬イソニアジド、ワルファリンの代謝に関与する VKORC1、グルクロン酸転移酵素であり抗がん薬の塩酸イリノテカンの副作用の発現に関与している UGT1A1 を対象として、理化学研究所と連携して SmartAmp 法による SNP 検出キットの開発を行う。

生活習慣病に関わる遺伝子として、脂肪組織での熱産生ならびに脂肪分解に関連する $\beta 3$ アドレナリン受容体遺伝子の SNP として $\beta 3$ AR (Trp64Arg) ならびに甲状腺ホルモンを活性化する 2 型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素遺伝子 (DIO2) の Thr92Ala の SNP について肥満者を対象として検討すると同時に、脂肪組織における脂肪分解に関与する $\beta 2$ アドレナリン受容体 ($\beta 2$ AR) 遺伝子、脂肪細胞の肥大化およびインスリン抵抗性に関連する peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 遺伝子、脂肪組織の熱産生に関連する Uncoupling protein-1 (UCP-1) 遺伝子、インスリン受容体基質であり、インスリン抵抗性に関連する Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) 遺伝子、インスリン抵抗性を惹起するアディポサイトカインである resistin 遺伝子を対象として SmartAmp 法を用いた遺伝子解析キットの開発を行う。

4. 研究成果

ワルファリンは、心房細動などによる血栓塞栓症の予防薬として用いられているが、その抗凝固効果は個人差が大きい。ワルファリンの抗凝固作用に関与する SNP として、ビタミン K エポキシド還元酵素複合体 1 (VKORC1) 遺伝子多型、CYP2C9*3 遺伝子多型、CYP2C9*2 遺伝子多型が知られている。本研究において、本学の病態薬理学分野と協力して、VKORC1 に関しては -1639G/A、CYP2C9 については、野生型 (*1) と、CYP2C9*2 及び CYP2C9*3 のタイピングシステムを開発して報告した (Clin Chem 55, 2009, 804-812)。

群馬大学教育学部保健体育学教室と共同で群馬大学の地域貢献事業として地域住民の健診を行い、400 例以上の対象者に 75 g 経口糖負荷試験を実施してきた。この検査結果から HOMA- β や insulinogenic index で表わされるインスリン分泌能ならびに HOMA-R で表わされるインスリン抵抗性を解析し、エネルギー代謝に関わる遺伝子の一塩基多型 (SNP) との関連について SmartAmp 法を用いて検討を行った。その結果、細胞内局所で甲状腺ホルモンの T4 を T3 に変換して活性化する 2 型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素 (D2) の遺伝子 (DIO2) の Thr92Ala の SNP がインスリン分泌能の低下に関連していることが明らかとなった。我々は D2 が骨格筋や褐色脂肪組織に発現していることを見出したが、近年は脂肪酸による TGR5 を解するエネルギー代謝に D2 が重要な役割を果たしていることが報告され、これまではインスリン抵抗性と D2 の関連について研究が進められてきたが、今回の我々の解析結果はインスリン分泌調節における D2 の役割の可能性を示唆す

るといふ新たな視点を提供するものである。

また、熱産生ならびに脂肪分解に関与する $\beta 3$ アドレナリン受容体 ($\beta 3AR$) 遺伝子の Trp64Arg の SNP、 $\beta 2$ アドレナリン受容体 ($\beta 2AR$) 遺伝子の Arg16Gly の SNP、Uncoupling protein-1 (UCP-1) 遺伝子の -3826A/G の SNP について SmartAmp 法により検討した。その結果、それぞれの SNP は単一では身体所見に有意な差異を認めなかった。しかしながら、 $\beta 2AR$ Arg/Arg と UCP-1 G/G の genotype の組み合わせで有意にウエスト/ヒップ比が上昇し、 $\beta 3AR$ Arg、 $\beta 2AR$ Arg および UCP-1 G の allele 保有数が増えるほど有意なウエスト/ヒップ比の上昇が認められた。このように、肥満に関連する遺伝子の SNP の組み合わせと肥満の程度との関連が認められ、SmartAmp 法による迅速、簡便かつ安価な遺伝子解析技術が、肥満の個別化予防に有用である可能性が示された。

近年、脂質異常症や動脈硬化症などの原因として潜在性甲状腺機能低下症が注目されているが、その原因については橋本病以外の病態は不明な点が多い。研究代表者らは、潜在性甲状腺機能低下症の原因となりうるいくつかの TSH 受容体遺伝子の変異を同定して報告したが、それらの中で本邦では R450H の頻度が高いことが判明した。本研究において、TSH 受容体遺伝子の R450H の変異を同定する SmartAmp 法のキットの開発に成功した。本キットを用いて数例の TSH 受容体遺伝子変異 R450H の症例を見出し、病態の解析を行っている。

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 17 件)

- ① Takahashi K, Murakami M, Kikuchi H, Oshima Y, Kubohara Y: Derivatives of Dictyostelium differentiation-inducing factors promote mitogen-activated IL-2 production via AP-1 in Jurkat cells. Life Sci 査読有 88, 2011, 480-485
- ② Kimura T, Tomura H, Sato K, Ito M, Matsuoka I, Im DS, Kuwabara A, Mogi C, Itoh H, Kurose H, Murakami M, Okajima F: Mechanism and role of high-density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. J Biol Chem 査読有 285, 2010, 4387-4397
- ③ Yanagawa Y, Morimura T, Tsunekawa K, Seki K, Ogiwara T, Kotajima N, Machida T, Matsumoto S, Adachi T, Murakami M: Oxidative stress associated with rapid weight reduction decreases circulating adiponectin concentrations. Endocr J 査読有 57, 2010, 339-345
- ④ Sumino H, Ichikawa S, Kasama S, Takahashi T, Sakamoto H, Koizumi A, Kanai H, Araki Y, Itoh T, Iwasaki T, Sawada Y, Saito Y, Kumakura H, Takayama Y, Kanda T, Murakami M, Sakamaki T, Kurabayashi M: Effects of raloxifene on brachial arterial endothelial function, carotid wall thickness, and arterial stiffness in osteoporotic postmenopausal women. Int Heart J 査読有 51, 2010, 60-67
- ⑤ Sumino H, Ichikawa S, Kasama S, Takahashi T, Kumakura H, Takayama Y, Kanda T, Murakami M, Kurabayashi M: Effects of raloxifene on the renin-angiotensin-aldosterone system and blood pressure in hypertensive and normotensive osteoporotic postmenopausal women. Geriatr Gerontol Int 査読有 10, 2010, 70-77
- ⑥ Bessho K, Etani Y, Ichimori H, Miyoshi Y, Namba N, Yoneda A, Ooue T, Chihara T, Morii E, Aoki T, Murakami M, Mushiake S, Ozono K: Increased type 3 iodothyronine deiodinase activity in a regrown hepatic hemangioma with consumptive hypothyroidism. Eur J Pediatr 査読有 169, 2010, 215-221
- ⑦ Kotajima N, Yanagawa Y, Aoki T, Tsunekawa K, Morimura T, Ogiwara T, Nara M, Murakami M: Influence of Thyroid Hormones and Transforming Growth Factor- β 1 on Cystatin C Concentrations. J Int Med Res 査読有 38, 2010, 1365-1373
- ⑧ Machida T, Sumino H, Fukushima M, Kotajima N, Amagai H, Murakami M: Blood rheology and the low-density lipoprotein cholesterol/high-density lipoprotein cholesterol ratio in dyslipidaemic and normolipidaemic subjects. J Int Med Res 査読有 38, 2010, 1975-1984

- ⑨ Aomori T, Yamamoto K, Oguchi-Katayama A, Kawai Y, Ishidao T, Mitani Y, Kogo Y, Lezhava A, Fujita Y, Obayashi K, Nakamura K, Kohnke H, Wadelius M, Ekström L, Skogastierna C, Rane A, Kurabayashi M, Murakami M, Cizdziel PE, Hayashizaki Y, Horiuchi R: Rapid single-nucleotide polymorphism detection of cytochrome P450 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genes for the warfarin dose adjustment by the SMart-amplification process version 2. Clin Chem 査読有 55, 2009, 804-812
- ⑩ Kamiyo T, Murakami M: Regular physical exercise improves physical motor functions and biochemical markers in middle-age and elderly women. J Phys Act Health 査読有 6, 2009, 55-62
- ⑪ Nara M, Sumino H, Nara M, Machida T, Amagai H, Nakajima K, Murakami M: Impaired blood rheology and elevated remnant-like lipoprotein particle cholesterol in hypercholesterolaemic subjects. J Int Med Res 査読有 37, 2009, 308-317
- ⑫ Takahashi K, Murakami M, Hosaka K, Kikuchi H, Oshima Y, Kubohara Y: Regulation of IL-2 production in Jurkat cells by Dictyostelium-derived factors. Life Sci 査読有 85, 2009, 438-443
- ⑬ Abdulah R, Faried A, Kobayashi K, Yamazaki C, Suradji EW, Ito K, Suzuki K, Murakami M, Kuwano H, Koyama H: Selenium enrichment of broccoli sprout extract increases chemosensitivity and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. BMC Cancer 査読有 9, 2009, 414
- ⑭ Kamiya Y, Murakami M: Type 2 diabetes mellitus accompanied by isolated adrenocorticotrophic hormone deficiency and gastric cancer. Intern Med 査読有 48, 2009, 1031-1035
- ⑮ Itakura H, Kishi S, Kotajima N, Murakami M: Decreased vitreal hyaluronan levels with aging. Ophthalmologica 査読有 223, 2009, 32-35
- ⑯ Kimura T, Mogi C, Tomura H, Kuwabara A, Im DS, Sato K, Kurose H, Murakami M, Okajima F: Induction of scavenger receptor class B type I is critical for simvastatin enhancement of high-density lipoprotein-induced anti-inflammatory actions in endothelial cells. J Immunol 査読有 181, 2008, 7332-7340
- ⑰ Sumino H, Ichikawa S, Kasama S, Takahashi T, Sakamoto H, Kumakura H, Takayama Y, Kanda T, Murakami M, Kurabayashi M: Relationship between carotid atherosclerosis and lumbar spine bone mineral density in postmenopausal women. Hypertens Res 査読有 31, 2008, 1191-1197
- [学会発表] (計 7 件)
- ① 村上正巳、甲状腺ホルモン代謝調節と疾患、第 11 回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会、2011. 3. 5、横浜
- ② 村上正巳、糖尿病の診断基準と HbA1c の標準化、第 47 回日本臨床生理学会総会、2010. 11. 20、前橋
- ③ 村上正巳、臨床検体の研究利用における倫理的問題について、第 57 回日本臨床検査医学会学術集会、2010. 9. 11、東京
- ④ 村上正巳、甲状腺疾患と臨床検査、第 17 回軽井沢免疫セミナー、2010. 6. 12、軽井沢
- ⑤ 常川勝彦、村上正巳、新規迅速遺伝子解析技術 SMAP 法を用いた肥満関連遺伝子多型と内臓脂肪との関連性の検討、第 56 回日本臨床検査医学会学術集会、2009. 8. 27、札幌
- ⑥ 村上正巳、甲状腺ホルモン脱ヨード酵素と疾患、第 82 回日本内分泌学会学術集会、2009. 4. 23、前橋
- ⑦ 常川勝彦、村上正巳、地域住民における 2 型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素遺伝子多型の糖代謝に及ぼす影響の検討、第 55 回日本臨床検査医学会学術集会、2008. 11. 29、名古屋
- [図書] (計 4 件)
- ① 村上正巳、南江堂、今日の臨床検査、2011、625
- ② 村上正巳、総合医学社、パーフェクトガイド検査値事典、2011、725
- ③ 村上正巳、診断と治療社、甲状腺疾患と

自己抗体検査、2010、70

- ④ 村上正巳、ヌーヴェルヒロカワ、臨床病態学総論、2009、282

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：インターロイキン-2産生抑制剤
発明者：久保原禪、村上正巳、高橋克典、大島吉輝、菊地晴久
権利者：群馬大学、東北大学
種類：A61P 37/06
番号：2009-112974 (国際出願PCT/JP2010/057763)
出願年月日：2009年5月7日(国際出願日2010年5月6日)
国内外の別：国内、国際

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 正巳 (MURAKAMI MASAMI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30241871

(2) 研究分担者

山本 康次郎 (YAMAMOTO KOUJIROU)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70174787

奈良 誠人 (NARA MAKOTO)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80420165

荻原 貴之 (OGIWARA TAKAYUKI)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：80361377

森村 匡志 (MORIMURA TADASHI)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：20436306

常川 勝彦 (TSUNEKAWA KATSUHIKO)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30436307

(3) 連携研究者

レジャバ アレキサンダー (Lezhava Alexander)

独立行政法人理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター・専任研究員

研究者番号：40443048