

機関番号：32713  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008 ～ 2010  
 課題番号：20590549  
 研究課題名（和文） テーラーメイド医療の実用化研究：システムの迅速化と担当医へのフィードバック  
 研究課題名（英文） The Practical Use Study of Tailor made medicine: Accerelate of genotyping System and Feedback System to Primary Doctor  
 研究代表者  
 小林 真一（KOBAYASHI SHINICHI）  
 聖マリアンナ医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：20129836

研究成果の概要（和文）：各種 CYP やトランスポーターを効率的にジェノタイピングするシステムの構築を行った。ダイレクトシークエンス法では CYP2D6、CYP3A4 それぞれ数箇所の評価でタイピングを行い短時間にそして精度を持って多くの遺伝子多型を判定できるシステムを構築した。また、新たに開発された SmartAmp 法の導入も試みたが、現在のところ解析できる遺伝子が CYP2C9\*3 のみで今後キットを増やす予定がないため、検討課題となった。本研究期間にも新たに外科手術により肝臓組織の切除を受ける患者より同意の得られた検体を採取した。これら検体についても新たにジェノタイピングを行い、データベースに加えた。遺伝子多型情報のフィードバックシステムに関しても外科医から患者への説明のための各ジェノタイプにおける平易でより具体的な情報の添付の要望が寄せられた。

研究成果の概要（英文）：We were constructed the genotyping system which was efficiently measurement of genotype for CYP and transporter. The system which was able to analyze a lot of multi genotypes with accuracy in a short time was constructed for CYP2D6 and CYP3A4. During this experimental period, new sample was collected and done genotyping. Surgeon was request more simple information of the feedback system of multi genotype.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学、応用薬理学

キーワード：テーラーメイド医療、抗癌薬、遺伝子多型、薬物代謝酵素、トランスポーター、DPD、ハプロタイプ

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム計画が終了し、多くのゲノム上での遺伝子の働きが明らかになってきた。さらに H a p M a p 計画により人種を含めた遺伝子の配列の違いが明らかになってきつつある。遺伝子多型と疾患に関する研究はヒトゲノム配列が明らかになったあと、国内外で急速に行われ、一定の成果が上がりつつある。疾患の原因としての遺伝子多型の役割は従来一つの遺伝子多型で説明がつくと考えられていたが、遺伝子異常の場合を除き遺伝子多型では報告が少ない。むしろ複数の遺伝子多型の組み合わせで疾患の成因を説明するほうが合理的という考え方が広まってきた。しかしながら、複数の遺伝子多型の組み合わせで疾患の成因としての意義を調べた報告は抗精神病薬に関するもの以外、多くはない。また、遺伝子多型と薬物代謝の研究は臨床薬理学の分野では多く行われているが、この情報を実際の臨床での薬物療法に実用化する研究はほとんどない。最近、マイクロアレイで SNPs の網羅的解析を迅速に行うシステムの開発が進められているが、大変高額で数千から数万箇所の SNP を対象としているため無駄な情報も多く、現実的ではない。また、それぞれの遺伝子多型の疾患における意義も明かでないために非合理的である。このため必要な SNPs のみを解析する迅速システムの構築がテーラーメイド医療の実現に向けて急務である。さらにテーラーメイド医療の実現化が望まれる中、具体的に当該患者を対象とした遺伝子情報のフィードバックと治療への情報の利用に関する研究もほとんど行われていない。

## 2. 研究の目的

テーラーメイド医療の実用化を図るため、遺伝子多型診断の迅速化と担当医へのフィードバックシステムの構築を目的とする。具体的には必要な薬物代謝酵素の遺伝子多型を迅速に解析して遺伝子多型と代謝能の関係を当該患者個人で明らかにして、術後の抗癌薬を中心に他薬物も含めた薬物治療をより安全に有効に行うためのシステムの確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) HepG2 培養細胞から genomic DNA をキットにより抽出し定量した。その後、現在遺伝子多系解析に用いているダイレクトシーケンス法と RFLP 法および Allele-specific PCR 法、Hybridization probe 法について遺伝子多型部位での GC% と Tm 値を基に遺伝子多型解析の至適条件の検討を行った。ダイレクトシーケンス法ではプライマー設計の関係で各読み取り位置の長さが 500bp であり、Allele-specific PCR 法、Hybridization probe 法では長すぎたため、100bp 程度の長さにするプローブを新たに設計しなおした。

(2) 本研究について本学生命倫理委員会で審査・承認を受けた。その後、治療のため本学病院にて外科手術により肝臓組織の切除を受ける患者を対象として説明、文書による同意を得た。同意の得られた患者より切除された肝臓組織の一部を液体窒素により凍結後、解析まで -70 度で保存した。本組織を上記で決定した新たなマルチジェノタイピング法に用いた。キットにより肝臓組織から genomic DNA を抽出し、定量して検体とした。上記 (1) で検討した方法の中で迅速かつ精度が高かった方法を従

来構築してきたマルチジェノタイピングシステムに加えて結果を比較して現在確立しているマルチジェノタイピングシステムの实用化への改良を行った。また、担当医とこれら結果を提示して担当医の理解が得られやすい遺伝子多型情報のフィードバックシステムのフォーマットを検討してこれを構築した。そしてマルチジェノタイピングの結果を患者の今後の薬物治療の方針と併せて評価し、結果を、個人情報管理者を通して外科医に情報提供を行った。

#### 4. 研究成果

(1) CYP2C9 や CYP2C19 に関しては従来のダイレクトシーケンス法に比べ Allele-specific PCR 法により迅速なジェノタイピングが行えるようになった。しかしながら Allele-specific PCR 法もまれに測定エラーがでることがあった。この原因としてプライマー配列の確実性、アニーリング温度の設定、Mg<sup>2+</sup>濃度の問題、人為的エラーなどが考えられる。一方ダイレクトシーケンス法は直接配列を読み取るために確実性は高かった。このため今後も確実性を高めるためにはダイレクトシーケンス法も合わせて行う必要がある。また、新たに開発された SmartAmp 法の導入も試みてみたが、現在のところ解析できる遺伝子が CYP2C9\*3 のみであるため、今後の検討課題となった。

(2) CYP2D6、CYP3A4 や MDR-1 については数か所の遺伝子多型を同時に評価しなければならず、日本人で遺伝子多型が多く報告されているこれらについては従来のマルチジェノタイピング法が正確に多くの遺伝子多型を判定できることから適していることが明らかとなった。ダイレクトシー

クエンス法では CYP2D6 では 4 箇所、CYP3A4 では 6 箇所の遺伝子多型を同時に評価しなければならなかったが、これまでに行ってきたハプロタイプ解析結果を見直し、それぞれ 2 箇所の評価でタイピングできることが明らかとなった。従来のマルチジェノタイピング法よりも短時間にそして精度を持って多くの遺伝子多型を判定できることからシステムとして適していることが明らかとなった。これら研究の中で原疾患別のアリル頻度を解析すると CYP2D6\*4,\*5,\*10 の遺伝子多型については肝細胞癌、胆道系腫瘍を原疾患とするものが転移性腫瘍よりも頻度が有意に高いことが明らかとなった。また MDR-1 では 2677 番目が A の遺伝子多型は肝細胞癌、胆道系腫瘍を原疾患とするものが転移性腫瘍よりもアリル頻度が有意に高いこと、3435 番目が C の遺伝子多型は肝細胞癌、胆道系腫瘍を原疾患とするものが転移性腫瘍よりもアリル頻度が有意に低いことが明らかとなった。

(3) UGT1A については各分子種が一つのゲノムから読み取られるために、プライマー設計も複数箇所検討したが、結果的に特異的な増幅が困難であった。Allele-specific PCR 法では解析結果の再現性に問題があった。そこでいったん PCR にかけてダイレクトシーケンス法で遺伝子多型を読み取ったほうが正確に評価できることが明らかとなった。

(4) この研究を通じて新たに外科手術により肝臓組織の切除を受ける患者より文書同意の得られた検体を採取した。これら検体についても新たにジェノタイピングを行い、従来からデータを蓄積してきたデータベースに情報を加えた。本研究では非感染性の肝臓組織を主に用いたので B 型肝炎

やC型肝炎の患者からの組織が使用できず、本件旧を通じて 17 例の検体の解析が可能であった。

(5) 遺伝子多型情報のフィードバックシステムに関し検討を重ねた。外科医から患者への説明のために各ジェノタイプにおける具体的な薬物動態の変化に関する情報の添付の要望が寄せられた。このため各遺伝子多型がどの程度薬物動態に影響を及ぼすかを理解してもらうためにこれまでに報告されているデータを付記して説明を加えるようにした。しかしながら、その結果報告書のボリュームが増えすぎてしまい、かえってわかりにくいとの意見が多かった。具体的には CYP2D6\*5 や CYP2D6\*10 については明確な薬物動態への影響の結果があったので理解してもらい易かったが、CYP3A4 や MDR-1、CYP2C9 などは遺伝子多型の薬物動態に与える影響よりも個人差による影響が強く、遺伝子多型の解析結果を臨床に反映するにはさらなる検討が必要であることが明らかとなった。

#### 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 2 件)

①Yuko Takeba, Naoki Matsumoto, Sachiko Takenoshita-Nakaya, Yoshie Harimoto, Toshio Kumai, Yuichi Kinoshita, Hiroshi Nakano, Takehito Ohtsubo, Shinichi Kobayashi.、 Comparative Study of Culture Conditions for Maintaining CYP3A4 and ATP-Binding Cassette Transporters Activity in Primary Cultured Human Hepatocytes.、 Journal of Pharmacological Sciences.、 査読有、 vol. 115、 No.4、 2011、 pp.516-524.

②Yanagida Y, Watanabe M, Takeba Y, Kumai T, Matsumoto N, Hayashi M, Suzuki S, Kinoshita Y, Kobayashi S.、 Potential of lansoprazole as a novel probe for cytochrome P450 3A activity by measuring lansoprazole sulfone in human liver microsomes.

Biol Pharm Bull.、 査読有、 vol.32、 No. 8、 2009、 pp.1422-1426.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

小林 真一 (KOBAYASHI SHINICHI)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20129836

##### (2)研究分担者

熊井 俊夫 (KUMAI TOSHIO)  
聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号：40139671

田中 政巳 (TANAKA MASAMI)  
聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授  
研究者番号：00171801

中野 浩 (NAKANO HIROSHI)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10241035  
(H20~21：研究分担者)

竹ノ下 祥子 (TAKENOSHITA SACHIKO)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10386948  
(H20~21：研究分担者)

##### (3)連携研究者

なし