

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08895

研究課題名(和文) 保険薬局薬剤師連携による薬効・副作用発現の個人差に関する遺伝的要因の解明

研究課題名(英文) Elucidation of genetic factors related to individual differences in the occurrence of drug efficacy and side effects through cooperation with insurance pharmacists

研究代表者

木下 健司 (Kinoshita, Kenji)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：70441219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：既存のRT-PCR法は、試料中のDNAを抽出・精製する操作に再現性の問題があり、改善の余地があった。申請者は水溶紙を用いて唾液を浸漬乾燥後、その小片を直接PCR溶液に添加して遺伝子解析する方法を確立した。この方法は迅速、簡易、高精度、高再現性の遺伝子解析方法である。このサンプル処理法を用いて、TaqManプローブ法による一塩基多型並びにコピー数多型解析法を開発した。この方法は唾液を用いるため、低侵襲で、乾燥後の検体は室温保存が可能となし、通常郵便での郵送も可能である。その有効性を検証するため学生206名のアルコール体質遺伝子解析を実施し、その結果は学術誌に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルコール体質遺伝子検査を用いた未成年者飲酒事故防止活動を大学(武庫川女子大学、昭和大学薬学部、九州大学、鹿児島大学、佐賀大学、東京家政大学など)の新入生を対象に実施しており、今後も継続実施する。また、日本薬学会関西支部および日本生物工学会主催の市民講座、日本薬剤師会及び日本薬局協会の各支部団体の薬剤師対象セミナー並びに企業社員教育として、「アルコール体質検査と飲酒の功罪」の啓発活動を行っており、今後も継続実施する。

研究成果の概要(英文)：The existing RT-PCR method had a problem of reproducibility in the operation of DNA extraction and purification from the liquid biopsies such as saliva. The applicant established a method in which saliva was immersed and dried using water-soluble paper, and then the small piece was added directly to the solution for PCR analysis. This method is a rapid, simple, highly accurate, highly reproducible gene analysis method. Using this sample processing method, single nucleotide polymorphism and copy number polymorphism analysis methods by the TaqMan probe method were developed. Since this method uses saliva, it is minimally invasive, and the dried sample can be stored at room temperature and can also be mailed by regular mail. In order to verify its effectiveness, we conducted an alcohol metabolism related genes analysis of 206 students and reported the results in an academic journal.

研究分野：分子生物学

キーワード：アルコール体質検査

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬品の適正使用のために、薬剤感受性遺伝子の情報解析が有効であることが知られている。例えば血栓溶解剤ワルファリン代謝関連酵素(CYP2C9 や VKORC1)、プロトンポンプ阻害薬オメプラゾールの代謝酵素(CYP2C19)などについては広く知られており、アメリカ食品医薬品局(FDA)では治療開始前にこれらの遺伝多型を検査する事が望ましいと勧告している。しかし患者個人の遺伝子情報に合わせて最適な薬物治療を行う個別化医療が大きく普及しているとは言い難い。一つの要因として、実際に薬品を取り扱う薬剤師が加担していない現実がある。これらの遺伝子以外にも、今後、多くの薬剤感受性に関連する遺伝子が明らかにされる必要がある。本申請では、鎮咳薬(主成分デキストロメトルファン)を服用すると5%以上の頻度で眠気の副作用症状が現れると報告されているデキストロメトルファン(メジコン錠[®]添付文書、シオノギ製薬)の主代謝酵素 CYP2D6 の遺伝子多型の副作用発現と遺伝的要因に着目した。代謝酵素 CYP2D6 の遺伝子多型解析は非常に複雑で困難なターゲットであり、現在のファーマコゲノミクス(ゲノム薬理学)を応用した「個別化医療」実現の臨床的障壁となっている。これに対して、現行の遺伝子検査法に比較して圧倒的に安価・迅速・非侵襲・簡便で確実な薬物代謝酵素遺伝子多型解析法を開発することにより、薬剤感受性遺伝子に関する研究を進めること、及び、遺伝子検査結果に基づいた薬剤師による処方提言(用法・用量・薬剤選択)を職能の一つとして捉えられると考えた。

2. 研究の目的

本研究である「保険薬局薬剤師連携による薬効・副作用発現の個人差に関する遺伝的要因の解明」には、遺伝子解析法の簡便化による個別化医療の一般化と、患者に向き合う薬剤師という二つの大きな目的がある。個別化医療の一般化のために、従来の病気になってからの遺伝子解析ではなく、健康なうちに遺伝子タイプを調べておくための技術基盤確立と情報共有に着目した。これは同時に薬剤師が遺伝子情報を用いて、患者の治療を目的とした薬の効能と安全性を最適化する役目を担うことを意味する。本申請では、鎮咳薬の主成分デキストロメトルファンの主代謝酵素 CYP2D6 の遺伝子多型解析実験系の簡略化とデータ安定性を検証し、患者における薬効・副作用発現の個人差要因を解明し、薬剤師が処方提言できる基盤を構築する。

3. 研究の方法

本研究では、水溶紙に口腔粘膜細胞を含有する唾液を浸透させ、乾燥させたもの(唾液乾燥水溶紙)を検体として使用して、薬物代謝酵素 CYP2D6 の遺伝子多型解析法の最適条件を確立させる。まずは、口腔粘膜細胞の採取方法及びコピー数多型解析法の確立を行い、薬学部学生を対象に遺伝子解析を行い、既報の日本人の遺伝子多型分布とで比較を行う。本研究は、薬剤師の連携により患者の検体を採取するため、各群の症例数確保に時間を要するため、28年度から4年をかけておこなう。

4. 研究成果

迅速・簡便・高精度・安価な SNP 解析方法の開発

技術的には、既存 RT-PCR 法は汎用されているが、唾液試料中の微量の DNA を抽出・精製する操作段階に再現性の問題があり、改善の余地があった。そこで、申請者は水溶紙を用いて唾液浸漬乾燥後、水溶紙の一定量をパンチングで採取し、それを蒸留水中で溶解・加熱処理後、その溶液を直接 PCR 溶液に混和しサンプルとし、直接 RT-PCR 機器で分析するという方法を確立し、キットを作製した(下図参照)。この方法の特徴は DNA 抽出操作がない点で迅速、簡易、高精度、高再現性である。この方法を用いて、TaqMan[®]プローブ法による一塩基多型(SNP)、並びにコピー数多型(CNV)解析法を開発し、数件の特許(含出願中)を保有している(特許第5875230号「遺伝子の増幅方法、特定遺伝子の検出方法」、特願2017-070962「水溶紙を含むサンプル調製用材料およびそれを用いるサンプル調製方法」以上2件 特許権利者：一般社団法人生命科学教育研究所)。この方法は唾液を用いるため、低侵襲で、乾燥後の検体は室温保存が可能なうえ、遺伝子検査装置がある検査室へ通常郵便での郵送も可能である。そのコストは一遺伝子あたり約200円の試薬・消耗品代と安価で、多検体試料(1プレート:96検体)の調整から遺伝子解析に要する時間は約3時間という臨床研究に適した方法である。本法の有効性を検証するため、薬学部生206名のアルコール体質遺伝子(*ADH1B*, *ALDH2*)解析を実施して、その結果は学術誌に報告した(新規な遺伝子検査プロトコル開発とアルコール代謝関連遺伝子多型への応用, 薬学雑誌, 139, 1111-1119, 2019)。

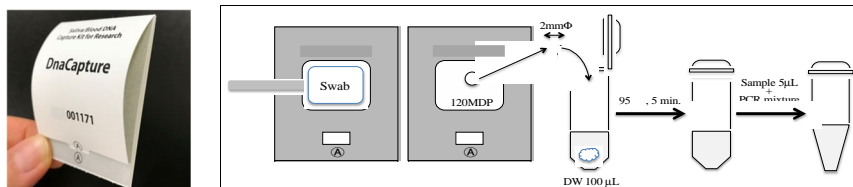


図 唾液サンプリングキットによる遺伝子検査までのプロセス

RT-PCR 法によるコピー数多型 (CNV) 検査方法の確立

乳がん治療薬タモキシフェンの代謝酵素遺伝子 *CYP2D6* は*5 の遺伝子欠損から重複という非常に複雑な遺伝子多型が観察され、薬物代謝の個人差に大きく関与している。申請者は、口腔粘膜細胞数に個人差の少ない唾液採取法を確立し、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法によるコピー数多型 (CNV) を唾液から迅速・簡便・安価に遺伝子解析する方法を開発し、特許出願後、国際学会及び学術雑誌に報告した。更に、英国科学雑誌「Science Impact」に掲載された(Elucidation of genetic factors related to individual differences in drug efficacy. *Impact*, August, 78-80, 2019)。

国際公開特許 WO2018/181850 「水溶紙を含むサンプル調製用材料およびそれを用いるサンプル調製方法」

国際公開特許 WO2018/025856 「簡便な遺伝子検査法およびコピー数計測法ならびにその支援技術」

Development of high-throughput TaqMan PCR-based *CYP2D6* SNP and CNV genotyping without DNA purification. 第78回国際薬剤師・薬学連合国際会議 2018,

Development of an Inexpensive and Rapid Operation Device for High-Throughput Real-Time Quantitative PCR-Based *CYP2D6* CNV genotyping. *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 1761-1765, 2019

Unique Genotyping Protocol of *CYP2D6* Allele Frequency using Real Time Quantitative PCR from Japanese Healthy Women. *Biol. Pharm. Bull.*, **43**, 904-907, (2020)。

アルコール体質遺伝子と飲酒習慣の研究とその普及活動

アルコール体質遺伝子検査を用いた未成年者飲酒事故防止活動を大学(武庫川女子大学、昭和大学薬学部、九州大学、鹿児島大学、佐賀大学、東京家政大学など)の新生を対象に実施しており、今後も継続実施する。また、日本薬学会関西支部および日本生物工学会主催の市民講座、日本薬剤師会及び日本薬局協会の各支部団体の薬剤師対象セミナー並びに企業社員教育として、演題「アルコール体質検査と飲酒の功罪」の啓発活動を行っており、今後も継続実施する。

水溶紙を応用してリキッドバイオプシー(血液、唾液など)から迅速・簡便・安価に遺伝子多型解析(一塩基多型(SNP)、コピー数多型(CNV)及び挿入・欠損多型(Del/Ins))のプロセス開発の実績がある。血栓溶解剤ワルファリンの初期投与量決定因子の薬物代謝酵素 *CYP2C9* 及びビタミン K エポキシド還元酵素 *VKORC1* の遺伝子多型解析法を開発した。更には、乳がん治療薬タモキシフェンの代謝酵素遺伝子 *CYP2D6* は*5 の遺伝子欠損から重複という非常に複雑なコピー数多型が観察されるが、申請者は、口腔粘膜細胞数に個人差の少ない唾液採取法を確立し、臨床研究に適した遺伝子多型解析する方法を開発した。アルコール体質遺伝子解析 (*ADH1B&ALDH2*) に関しては、これまでに未成年者飲酒事故防止及び適正飲酒を啓発する社会活動「アルコール体質検査と飲酒の功罪」を展開してきた。申請者のグループは、毎年約 5000 検体のアルコール体質検査を実施してきた実績がある。

【本研究関連の学術論文】

1. Kisoi M., Imai M., Yamamura M., Murata S., Ichikawa A., Kinoshita K., Unique Genotyping Protocol of *CYP2D6* Allele Frequency using Real Time Quantitative PCR from Japanese Healthy Women, *Biol. Pharm. Bull.*, **43**, 904-907, (2020)
2. Kisoi M., Imai M., Moritsugu M., Murata S., Ichikawa A., Kinoshita K., Development of an Inexpensive and Rapid Operation Device for High-Throughput Real-Time Quantitative PCR-Based *CYP2D6* CNV genotyping, *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 1761-1765, (2019)
3. 今井美穂, 競 和佳, 坂口友唯, 山村美和子, 河井沙由梨, 村田成範, 市川 厚, 木下健司, 新規な遺伝子検査プロトコル開発とアルコール代謝関連遺伝子多型への応用, *薬学雑誌*, **139**, 1111-1119, (2019)
4. Kisoi M., Moritsugu M., Imai M., Fukumoto K., Sakaguchi Y., Murata S., Ichikawa A., Kinoshita K., Rapid and Cost-Effective Genotyping Protocol for Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion (Ins/Del) Polymorphism from Saliva. Biological and Pharmaceutical Bulletin. *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 1345-1349, (2019)
5. Kinoshita K., Elucidation of genetic factors related to individual differences in drug efficacy. *Impact*, August, 78-80, (2019)

【本研究関連の特許出願】

WO2018/181850 水溶紙を含むサンプル調製用材料およびそれを用いるサンプル調製方法

WO2018/025856 簡便な遺伝子検査法およびコピー数計測法ならびにその支援技術

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 今井美穂、競和佳、坂口友唯、山村美和子、河井沙由梨、村田成範、市川厚、木下健司	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 新規な遺伝子検査プロトコル開発とアルコール代謝関連遺伝子多型への応用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 薬学雑誌	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Madoka Kisoi, Miwako Moritsugu, Miho Imai, Kae Fukumoto, Yui Sakaguchi, Shigenori Murata, Sayuri Kawai, Atsushi Ichikawa, Kenji Kinoshita	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Rapid and Cost-Effective Genotyping Protocol for Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion (Ins/Del) Polymorphism from Saliva	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 今井美穂、競和佳、森次美和子、坂口友唯、村田成範、木下健司
2. 発表標題 定量的リアルタイムPCRを用いたCYP2D6のコピー数多型解析法の確立
3. 学会等名 日本薬学会138回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂口友唯、競和佳、今井美穂、森次美和子、村田成範、木下健司
2. 発表標題 ハイスループットSNPタイピング法の開発
3. 学会等名 日本薬学会138回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Madoka Kisoi, Miho Imai, Miwako Moritsugu, Shigenori Murata, Kenji Kinoshita
2. 発表標題 Development of high-throughput TaqMan PCR-based CYP2D6 SNP and CNVgenotyping without DNA purification
3. 学会等名 78th FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Science 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考