

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790115

研究課題名（和文）血栓塞栓症の発症に関わる遺伝的因子の解明と発症リスクの予測

研究課題名（英文）Determination of the genetic factor which relates to the thromboembolism

研究代表者

中村 克徳（NAKAMURA KATSUNORI）

群馬大学・大学院医学系研究科 ・助教

研究者番号：20361363

研究成果の概要：（1）ワルファリン投与中に血液凝固能の指標となる PT-INR のコントロールがうまく出来ない患者について、末梢血からゲノム DNA を調製し、（2）ワルファリンの代謝および薬効発現に関与する CYP2C9、CYP2C19、VKORC1 遺伝子を、末梢血から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、PCR-RFLP、ダイレクトシーケンス法などにより解析した。（3）血栓塞栓症の発症に関わる遺伝的因子として考えられる VKORC1 遺伝子およびワルファリン代謝および薬効発現に関与する CYP2C9、CYP2C19 について遺伝子多型迅速判定法（SMAP 法）を開発し、本法が臨床現場で有効であるかを検討して論文発表した（Aomori ら、研究発表欄に記載）。発症リスクの予測を迅速に診断できる可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：遺伝子多型迅速判定法、ワルファリン、深部静脈血栓症、VKORC1、CYP2C9

1. 研究開始当初の背景

VKORC1 は肝ミクロゾームに存在する酵素 Vitamin K Oxide Reductase (VKOR) をコードする遺伝子である。VKOR は食品からでは十分に補うことが難しい Vitamin K を体内で再利用する酵素として重要である。一方、

ワルファリンは VKOR を競合的に阻害することによりその薬効（血液凝固系因子の生成阻害）を示す血栓塞栓症の予防・治療薬である。ワルファリンの効きすぎについては薬物代謝酵素 CYP2C9 の遺伝的多型で説明することが出来るが、ワルファリン抵抗性の原

因遺伝子およびその遺伝子多型は現在研究が始まったばかりである。

2. 研究の目的

本研究ではワルファリンを高用量必要とする患者をスクリーニングすることにより、ワルファリン抵抗性の原因を解明し、患者ごとに個別化したより適正な投与方法を確立することを目的とする。また、本研究課題の期間内にワルファリン抵抗性の原因となる遺伝子変異を導入した VKORC1 大腸菌発現系を構築し VKOR の機能を解析する。

3. 研究の方法

以下の方法に従った。

- (1) ワルファリン投与中の患者およびワルファリン投与を受けていない健常日本人の末梢血からゲノム DNA を調製した。
- (2) ワルファリンの代謝および薬効発現に関与する CYP2C9、CYP2C19、VKORC1 遺伝子について、末梢血から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、PCR - RFLP、ダイレクトシーケンス法などにより、遺伝子変異の有無を検出した。(消耗品として計上した制限酵素および Taq DNA ポリメラーゼを用いて解析した。)
- (3) 現在開発中の遺伝子多型迅速判定法が有効であるかについて検討し、解析を効率化する。さらに臨床応用の実現が可能かを検討した。
- (4) 既知の変異が存在しないワルファリン抵抗性を示す症例に対し、新規原因遺伝子の探索および既知のワルファリン抵抗性関連遺伝子の新規遺伝子変異を探索した。

- (5) 新規に発見した変異型 VKOR (アミノ酸変異 Cys16Ser、Asp38Ser、His68Arg 等を有する。) を発現する大腸菌を樹立し、ワルファリン反応性への影響を検討した。(現在継続中)

対象患者： ワルファリン投与を受けている患者。200 症例を目標とした。

患者・健常人被験者選択基準

以下の基準の全てを満たす患者および②、③の基準を満たす健常人

- ① ワルファリンを投与中の患者
- ② 年齢：18 歳以上
- ③ 本試験の参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、患者本人の自由意志による文書同意が得られた患者

除外基準

下記条件のいずれかに該当する患者

- ① 年齢：18 歳未満
- ② 文書による同意の得られない患者
- ③ その他、担当医師が不適切と判断した患者

入院・外来の別

入院・外来の別は問わない。

4. 研究成果

現在の血栓・塞栓症に対するワルファリン療法には、治療効果に大きな個人差が存在することが問題となっている。さらに人種間で血栓・塞栓症の治療および予防に用いるワルファリン投与量が大きく異なることが明らかになっている。本研究では CYP2C9 遺伝子多型頻度の人種差および個人差の他に、Vitamin K サイクルに関与する VKORC1 遺伝子型によって分類した投与量を設定することにより、早期の血液凝固能コントロールが可能となり、血栓・塞栓症に対するワルファ

リン療法の安全性と経済性を向上させることを可能とした。

本研究では現在まで、健常成人 114 名およびワルファリン投与を受けている125名の患者について VKORC1 遺伝子の 5' - 上流領域、翻訳領域およびその近傍の塩基配列を解析した。その結果、VKORC1 遺伝子のコーディング領域に従来報告されている変異と異なる 3 箇所のミスセンス変異（アミノ酸置換 Cys16Ser、Asp38Ser、His68Arg を生じる。）を新たに見出した。さらに、新規の変異を含む 8 箇所の変異を 5' -上流 (-107G>A、-102A del)、イントロン 1 (IVS1+10G>T、IVS1-10C ins、IVS1-115G>A、IVS1-137C>T)、イントロン 2 (IVS2+25CCCCGC ins、IVS2+125G>C) に見出した。本研究で明らかになった日本人およびポリビア人の遺伝子変異を既に報告されているイタリア白人と比較すると、その頻度に大きな差が認められた。本研究から *CYP2C9* の遺伝子多型による薬物動態の人種差に加えて、ワルファリンの血中濃度と作用発現にこれら VKORC1 遺伝子多型の人種差が影響を与える可能性が示唆された。

今後、VKORC1 遺伝子に認められた3 箇所のミスセンス変異 (Cys16Ser、Asp38Ser、His68Arg) を導入した大腸菌発現系を構築し、機能を解析することによりワルファリン抵抗性の原因を明らかにすることができる。

また、Vitamin K サイクルに関与する VKORC1 の遺伝子多型の日本人における頻度を明らかにすることで、従来から知られている *CYP2C9* の遺伝子型と VKORC1 遺伝子型を組み合わせて分類した投与量を設定することにより、早期の血液凝固能コントロールが可能となり、ワルファリン療法の安全性と経済性が向上することが期待される。さらに、血栓塞栓症の発症に関わる遺伝的因子候補と

考えられる VKORC1 遺伝子の遺伝子多型迅速判定法 (SMAP 法) を開発したことにより、深部静脈血栓症を含む血栓塞栓症の発症に関わる遺伝的因子の解明と発症リスクを迅速に診断することを可能とした。

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 3 件)

①Aomori T, Yamamoto K, Nakamura K. (他 18 名、11 番目) 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. 2009; 55(4): 804-812. (査読有)

②大林恭子、中村克徳、山本康次郎 (他 2 名、2 番目) 薬剤師による処方支援 ワルファリン投与における処方支援 医薬ジャーナル 44 巻 3 号 171-179、2008 (査読無)

③Okada Y, Nakamura K, Yamamoto K. (他 3 名、2 番目) Development of a single-tube PCR-pyrosequencing method for the simultaneous and rapid detection of four variant alleles of CYP2C9 gene polymorphism. J Clin Pharm Ther. 2008; 33(2): 187-192. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

①川名純一、小柳俊哉、下川智樹、大野哲郎、花田和彦、中村克徳、大林恭子、山本康次郎、堀内龍也、住吉徹哉、緒方宏泰、心臓血管外科手術後のワルファリンの初期導入成功例に対する PK/PD に関連した遺伝子多型の寄与

第 29 回日本臨床薬理学会年会 2008 年 12 月 4 日、東京

②青森達、山本康次郎、大林恭子、藤田行代志、中村克徳、倉林正彦、三谷康正、川井雄輝、片山敦子、林崎良英、堀内龍也 SMAP 法による CYP2C9、VKORC1 遺伝子型迅速判定のワルファリン投与量設定への応用
第 1 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2007 年 12 月 15 日、東京

③ Tohru Aomori, Koujirou Yamamoto, Yuki Yoshi Fujita, Kyoko Obayashi, Katsunori Nakamura, Masahiko Kurabayashi, Yasumasa Mitani, Yuki Kawai, Atsuko Oguchi-Katayama, Yoshihide Hayashizaki, Ryuya Horiuchi. Rapid detection of the polymorphisms of cytochrome P450 (CYP) 2C9 and the vitamin K oxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) genes for the warfarin dose adjustment by SMart-Amplification Process.
AJHP 2007 Midyer Clinical Meeting, 2007 年 12 月 2-6 日、Las Vegas, NV

④青森達、大林 恭子、中村克徳、山本康次郎、倉林正彦、長谷川昭、三谷康正、川井雄輝、片山敦、林崎良英、堀内龍也 SMAP 法による CYP2C9、VKORC1 遺伝子型迅速判定のワルファリン投与量設定への応用
第 17 回日本医療薬学会年会、2007 年 9 月 29 日、群馬

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 克徳 (NAKAMURA KATSUNORI)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20361363

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：