

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590154

研究課題名（和文） 薬物動態関連酵素の遺伝子多型とバリエーション酵素機能の解析

研究課題名（英文） Functional characterization of drug metabolizing enzyme genes and variant proteins

研究代表者

平塚 真弘 (HIRATSUKA MASAHIRO)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：50282140

研究成果の概要（和文）：

薬物代謝酵素 CYP2D6、CYP2B6 及びチオプリン S-メチルトランスフェラーゼ (TPMT) について、遺伝子多型が酵素機能に与える影響を *in vitro* で検証した。その結果、CYP2D6 では 17 種類、CYP2B6 では 26 種類、TPMT では 23 種類のバリエーション型酵素発現用ベクターを作製し、COS-7 細胞中にそれぞれを発現させることができた。野生型酵素と活性の変化を比較したところ、多くのバリエーションで機能変化が起きることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Drug metabolizing enzymes, CYP2D6, CYP2B6, and TPMT are enzymes of potential importance for the metabolism of clinically used drugs, and it exhibits genetic polymorphism with interindividual differences in metabolic activity. The aim of this study was to investigate the functional characterization of CYP2D6, CYP2B6, and TPMT variants. Functional characterization of 17 CYP2D6, 26 CYP2B6, and 23 TPMT variants revealed an altered enzyme activity of a number of allelic variants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ゲノム、酵素、薬剤反応性、遺伝子、蛋白質

1. 研究開始当初の背景

薬物投与前に患者の薬物動態関連酵素遺伝子の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) 解析を行い、その情報を基に各個人に最も適した医薬品の選択や投与量の決定を行うテーラーメイド医療が期待されている。これまで本邦でも国家的ミレニアムプロジェクトにより薬物動態関連酵素遺伝子の網羅的 SNP 解析が行われている。

しかしながら、それらの SNP を有する酵素遺伝子が実際にタンパク質として翻訳された時、どのような影響を及ぼすかについては解析が遅れている。それらのバリエーション酵素タンパク質の機能解析は煩雑な操作と専門的知識を必要とする分野であり、本邦におけるファルマコゲノミクスを利用したテーラーメイド医療進展のボトルネックとなっている。

ファルマコゲノミクス研究は、医薬品適正使用の点で、効果的な薬物療法の実施、重篤な副作用発現回避、QOLの低下防止などに貢献することが期待されている。現在、このような薬物動態関連酵素遺伝子の多型解析は全世界的に推進されており、すでに米国食品医薬品局（FDA）では一部の医薬品（イリノテカン及びメルカプトプリン）に関して、本剤投与前に遺伝子診断を行い、患者の遺伝子型情報を得ることが望ましいとする添付文書の改訂を行っている。さらにワルファリンではCYP2C9とVKORC1のSNP、タモキシフェンではCYP2D6のSNP解析が望ましいとする添付文書改訂が予定されているという情報も得られている。このような背景の下、医薬品開発の効率化を推進するために日米欧におけるブリッジングスタディーが展開されているが、日本人を含む黄色人種と白人種や黒人種の間には医薬品に対する感受性や体内動態が遺伝的に異なることが明らかになっており、人種間を超えた国際的整合性を確立することが非常に困難になっている。

特に、肝臓における代表的な薬物代謝酵素であるCYP2D6に関しては、そのバリエーションの多様性と遺伝子構造の複雑性から、本邦のミレニアムプロジェクトでも酵素機能解析がほとんど行われていない遺伝子である。また、日本人のCYP2D6遺伝子は白人種と著しく多型部位や頻度が異なるため、日本人種独自の解析が必要である。したがって、ファルマコゲノミクスを利用したテーラーメイド薬物療法を実現するために、このバリエーション酵素タンパク質の酵素化学的特性を解析することは避けて通れない。しかしながら、本邦において薬物動態関連酵素の遺伝子多型、ハプロタイプ及びタンパク質機能解析を総合的に行っている施設（実際にノウハウを有している施設）は非常に少ない。申請者らは、これまでも日本人や白人種における薬物動態関連酵素遺伝子多型の解析、ハイスループット遺伝子診断法の開発、ベッドサイド遺伝子診断法の開発、あるいはテーラーメイド薬物療法の臨床応用研究を独創的な視野で行っており、今回の課題に関しても、それらのノウハウを生かし、国民の健康を守る医薬品の適正使用に貢献する情報を得ることができると確信する。

2. 研究の目的

薬物代謝酵素CYP2D6は臨床現場で使用されている多くの医薬品の代謝を触媒する。現在、この酵素遺伝子のSNPは少なくとも100箇所以上見つかっており、そのバリエーションは50種以上存在する。そのうち、日本人集団で同定されているアレルは、CYP2D6*1, *2, *4, *5, *10, *14, *18, *21, *36, *39, *44, *47, *48, *49, *50, *51, *53, *54, *55

であるが、これらのどのアレル由来のタンパク質が酵素活性の減少（まれに増加）を引き起こすかは未だ詳細に検討されていない。そこで、これらのバリエーションアレルを挿入した哺乳類細胞用タンパク質発現ベクターを構築し、CYP2D6の代表的な基質医薬品であるデキストロメトルフアンを用いて、酵素機能の評価を行う。これにより、日本人集団においてCYP2D6で代謝される医薬品を服用する際、どの部分のSNPを事前に検出すべきかというファルマコゲノミクス基礎情報が得られる。次に抗癌剤シクロfosファミドや麻酔薬プロポフォール等の代謝酵素であり、SNPの存在により薬物動態が大きく変化することが予想されているCYP2B6について、CYP2D6と同様の手法を用い、26種のバリエーションタンパク質を作成し、機能評価する。さらに、メルカプトプリンやアザチオプリンの代謝酵素であるチオプリンメチルトランスフェラーゼ（TPMT）について、同様の手法を用い、23数種のバリエーションタンパク質を作成し、機能評価する。

最終的に、これらのファルマコゲノミクスに関するエビデンスを統合し、日本人集団において薬効予測や副作用回避に重要な遺伝子多型を特定する。

3. 研究の方法

(1) site-directed mutagenesisを用いたバリエーション型CYP2D6タンパク質発現ベクターの構築

すでにヒト肝cDNAライブラリーを鋳型として、全コーディング領域をカバーしたCYP2D6 cDNAの哺乳動物細胞用発現ベクターを作製している。本研究では、それらのクローンを用いて

site-directed mutagenesis法により各種SNPを導入する。作成する予定のバリエーション型は、これまでに日本人集団で同定されているCYP2D6バリエーションアレル（CYP2D6*2, *4, *10, *14, *18, *21, *36, *39, *44, *47, *48, *49, *50, *51, *53, *54, *55）17種類とする。

(2) サル腎由来COS-7細胞を用いたバリエーション型CYP2D6タンパク質の発現

100 mmのシャーレ（10 mLの培地）にCOS-7細胞を添加し、37°Cで24時間インキュベートする。CYP2D6発現プラスミド及びTransFectin Lipid ReagentはそれぞれOpti-MEM I Reduced-serum Mediumと混合する。次にこれらの溶液を混合後、室温で20分間インキュベートし、前述の100 mmのシャーレの液体培地中に添加後、穏やかに振とうし、インキュベーターにて37°Cで24時間培養する。次に100 mmのシャーレの培地を取り除き、予冷した滅菌済みPhosphate

buffered saline (PBS) で洗浄した後、予冷した 0.25 M Sucrose 1 mM EDTA-10 mM Tris HCl (pH7.4) で細胞を遠沈管に回収し、遠心分離し、上清を取り除く。再び 0.25 M Sucrose 1 mM EDTA-10 mM Tris HCl (pH7.4) で再懸濁後、ホモジネートし、マイクロチューブに移す。9,000×g、4°C で 20 分間遠心分離後、その上清を 105,000×g、4°C で 1 時間遠心分離する。得られた残渣を 10% Glycerol 1 mM EDTA-10 mM Tris HCl (pH7.4) で懸濁しこれをマイクロソーム画分とする。CYP2D6 の固有タンパク質量は抗 CYP2D6 抗体を用いたウェスタンブロット法で評価する。

- (3) デキストロメトルファンを基質とした CYP2D6 活性測定と酵素速度論的解析
得られた各発現タンパク質を用いて、CYP2D6 の基質であるデキストロメトルファン (DXM) を *in vitro* で代謝させ、代謝物であるデキストルファンを HPLC により定量し、酵素活性を算出する。また、様々な基質濃度にて活性測定を行い、Km 値及び Vmax 値のファルマコキネティックパラメーターを算出する。

- (4) 薬物代謝酵素 CYP2B6 遺伝子多型のバリエーション酵素機能評価

これまでに日本人及び他人種で同定されている CYP2B6 バリエーションアレル (CYP2B6*1~*28) 26 種類について、哺乳動物細胞発現ベクターを用いてバリエーションタンパク質を発現させ、酵素機能解析を行う。方法としては、CYP2D6 の場合と同様であるが、酵素化学的特性の解析には、特異的基質として 7-エトキシ 4-トリフルオロメチルクマリン及びプロポフォルを用いる。

- (5) TPMT バリエーション酵素機能評価

これまでに日本人及び他人種で同定されている TPMT バリエーションアレル (TPMT*1~*23) 23 種類について、哺乳動物細胞発現ベクターを用いてバリエーションタンパク質を発現させ、酵素機能解析を行う。方法としては、CYP2D6 の場合と同様であるが、酵素化学的特性の解析には、特異的基質として TPMT に関してはチオグアニンを用いる。

4. 研究成果

- (1) これまでに日本人集団で同定されている CYP2D6 バリエーションアレル 17 種類について、遺伝子多型が酵素機能に与える影響を *in vitro* で検証した。まず、ヒト肝 cDNA ライブラリーを鋳型として、野生型及びバリエーション CYP2D6 発現クローン (CYP2D6*2、*10、*14A、*14B、*18、*27、*36、*39、*47、*48、*49、*50、

*51、*53、*54、*55 及び*57) を作製した。野生型及びバリエーション CYP2D6 を COS7 細胞で発現させ、遠心法によりマイクロソーム画分を調製した後、抗 CYP2D6 抗体を用いたイムノブロット法により発現タンパク質を確認した。次に得られた各発現タンパク質を用いて CYP2D6 の特異的な基質である Bufuralol 及び Dextromethorphan を *in vitro* 代謝させ、各バリエーション酵素のキネティックパラメーター (Km、Vmax) を算出した。その結果、野生型及び今回構築したすべてのバリエーション CYP2D6 の発現が確認できた。CYP2D6 発現量は大部分のバリエーションにおいて有意な低下が認められた。また、酵素活性測定の結果、酵素機能が野生型と同程度のバリエーション 4 種類 (CYP2D6.2、27、39 及び 48)、低下あるいは欠損するバリエーション 12 種類 (CYP2D6.10、14A、14B、18、36、47、49、50、51、54、55 及び 57)、上昇するバリエーション 1 種類 (CYP2D6.53) を明らかとした。

- (2) これまでに日本人集団で同定されている CYP2B6 バリエーションアレル 26 種類について、遺伝子多型が酵素機能に与える影響を *in vitro* で検証した。まず、ヒト肝 cDNA ライブラリーを鋳型として、野生型 (CYP2B6*1) 及びバリエーション CYP2B6 発現クローン (CYP2B6*2~*28 (*22 を除く)) を作製した。野生型及びバリエーション CYP2D6 を COS7 細胞で発現させ、遠心法によりマイクロソーム画分を調製した後、抗 CYP2B6 抗体を用いたイムノブロット法により発現タンパク質を確認した。次に得られた各発現タンパク質を用いて CYP2D6 の特異的な基質である 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin を *in vitro* 代謝させ、各バリエーション酵素のキネティックパラメーター (Km、Vmax、CLint) を算出した。その結果、CYP2B6.8、CYP2B6.11、CYP2B6.12、CYP2B6.13、CYP2B6.15、CYP2B6.18、CYP2B6.21、CYP2B6.24 及び CYP2B6.28 の酵素活性は検出限界以下となり、野生型及びその他のバリエーションでは Michaelis-Menten の式に従うことが示された。

- (3) これまでに同定されている TPMT バリエーションアレル 23 種類について、遺伝子多型が酵素機能に与える影響を *in vitro* で検証した。まず、ヒト肝 cDNA ライブラリーを鋳型として、野生型 (TPMT*1) 及びバリエーション CYP2B6 発現クローン (TPMT*2~*24) を作製した。野生型及びバリエーション TPMT を COS-7 細胞で発現させ、TPMT の特異的な基質である 6-チオグアニンを *in vitro* 代謝させ、その代謝物を HPLC-蛍光検出器で定量し、各バ

リアント酵素のキネティックパラメータ (K_m , V_{max} , CL_{int}) を算出した。その結果、23 種類のバリエント型 TPMT 発現用クローンを作製し、COS-7 細胞中に TPMT タンパク質を発現させることができた。野生型である TPMT*1 と発現量を比較したところ、TPMT*2、*3A、*5、*12、*14、*18、*22 及び*23 で有意なタンパク質発現量の減少が認められた。TPMT*3A、*3B、*5、*14、*18、*21 及び*22 の酵素活性は検出限界以下となった。また、野生型及びその他のバリエントでは Michaelis-Menten の式に従うことが示された。本研究は、6-メルカプトプリン等のチオプリン系薬物の代謝酵素である TPMT について、アミノ酸置換を伴う TPMT 遺伝子多型が酵素活性に与える影響を検証したものであり、新たに酵素活性の低下を引き起こすバリエントアレルも明らかにした。今回得られた基礎的情報は、TPMT 遺伝子多型情報をチオプリン系薬物投与患者の選択指標として利用するために有用なものであると考えられ、今後、患者個々の遺伝子タイプを考慮した有効かつ安全な個別化薬物療法の推進へ貢献することが期待される。

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 6 件)

1. Functional characterization of genetic polymorphisms identified in the promoter region of the xanthine oxidase gene. Mutsumi Kudo, Takamitsu Sasaki, Masaaki Ishikawa, Noriyasu Hirasawa, Masahiro Hiratsuka. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 25, 599-604 (2010)、査読有
2. Kinetics of 6-thioxanthine metabolism by allelic variants of xanthine oxidase. Mutsumi Kudo, Takamitsu Sasaki, Masaaki Ishikawa, Noriyasu Hirasawa, Masahiro Hiratsuka. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 25, 361-366 (2010)、査読有
3. Functional characterization of 26 CYP2B6 allelic variants (CYP2B6.2-CYP2B6.28, except CYP2B6.22). Takashi Watanabe, Kanako Sakuyama, Takamitsu Sasaki, Yuya Ishii, Masaaki Ishikawa, Noriyasu Hirasawa, Masahiro Hiratsuka. *Pharmacogenet. Genom.*, 20, 459-462 (2010)、査読有
4. Genetic variations in the HGPRT, ITPA, IMPDH1, IMPDH2, and GMPs genes in Japanese individuals. Mutsumi Kudo, Yuka Saito, Takamitsu Sasaki, Hitomi Akasaki, Yuri Yamaguchi, Moe Uehara, Kiyomi Fujikawa, Masaaki Ishikawa, Noriyasu Hirasawa, Masahiro Hiratsuka. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 24, 557-564 (2009)、査読有
5. Functional characterization of 17 CYP2D6 allelic variants (CYP2D6.2, 10, 14A-B, 18, 27, 36, 39, 47-51, 53-55, and 57). Kanako Sakuyama, Takamitsu Sasaki, Shuta Ujiie, Kanako Obata, Michinao Mizugaki, Masaaki Ishikawa, Masahiro Hiratsuka. *Drug Metab. Dispos.*, 36, 2460-2467 (2008)、査読有
6. Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT*2-*24). Shuta Ujiie, Takamitsu Sasaki, Michinao Mizugaki, Masaaki Ishikawa, Masahiro Hiratsuka. *Pharmacogenet. Genom.*, 18, 887-893 (2008)、査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 平塚真弘、薬物代謝酵素遺伝子の SNP スクリーニングとバリエント酵素の機能変化解析に関する研究、日本薬物動態学会、2010年10月8日、埼玉
2. 平塚真弘、薬剤管理指導におけるファーマコゲノミクス情報の利用、第36回日本医療薬学会公開シンポジウム、2009年11月14日、仙台
3. 平塚真弘、Functional Characterization of Xanthine Oxidase Allelic Variants、13th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man、2009年6月24日、ストックホルム、スウェーデン
4. 作山佳奈子、平塚真弘、日本人における CYP2D6 バリエント酵素の機能解析、日本臨床薬理学会、2008年12月5日、東京
5. 平塚真弘、チオプリン S-メチルトランスフェラーゼの 23 種バリエント酵素の機能解析、日本薬物動態学会、2008年10月31日、熊本
6. 渡邊卓嗣、平塚真弘、CYP2B6 遺伝子多型によるバリエント酵素の機能解析、日本薬物動態学会、2008年10月31日、熊本

[図書] (計 1 件)

1. 平塚真弘、工藤睦、作山佳奈子、日本臨床、遺伝子診療学 (第 2 版) - 遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望、2010 年、

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平塚 真弘 (HIRATSUKA MASAHIRO)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：50282140

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：