

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月16日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659070

研究課題名（和文）薬物代謝酵素 CYP2D6 のイントロン SNP によりタンパク質発現量は変化するか？

研究課題名（英文）Are protein expression levels changed by intron SNPs on CYP2D6?

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 において、エキソンの SNP のみでは説明できない酵素活性の個人差を明らかにするために、イントロン SNP の影響を解析できるアッセイにより、タンパク質発現量の変化を評価した。その結果、陽性コントロールとして用いた CYP2D6*41 では、野生型 CYP2D6*1 と比較して 35% の発現低下が認められたのに対し、今回同定した 4 種類のバリエントは野生型と同程度の発現量であった。

研究成果の概要（英文）：We examined changes in the protein expression of the drug-metabolizing enzyme CYP2D6 by using an assay capable of analyzing the influence of intron SNPs, to determine the individual differences in protein activity that cannot be explained by exon SNPs alone. As a result, we found that while the positive control CYP2D6*41 showed a 35% decrease in protein expression compared to the wild-type CYP2D6*1, none of the other 4 variants differed greatly from the wild-type.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：薬物動態・代謝学

1. 研究開始当初の背景

薬物代謝酵素遺伝子のエキソン上に一塩基多型（SNP）が存在する場合、コードしているアミノ酸が置換され、タンパク質の構造が一部変化することで医薬品の代謝が変化する。さらにその結果、医薬品の体内動態が変化し、薬効や副作用発現に著しい個人差が現れることが報告されている。これまでに申請者らも薬物代謝酵素遺伝子のエキソン領域の SNP スクリーニングを行い、日本人集団に特徴的な新規 SNP を発見してきた。しかし、同じ遺伝子型でも酵素タンパク質の発現量には顕著な個人差が存在するため、エキソン領域の SNP 情報のみでは薬物代謝酵素活性の個人差すべてを説明できるわけではない。ヒトにおける薬物代謝酵素の中でも

CYP2D6 はタモキシフェンやアトモキセチンの代謝を触媒する主要な CYP 分子種である。これまでに CYP2D6 では 70 種以上の遺伝子多型バリエントアレルが報告されているが、そのほとんどがエキソン上の SNP によるものである。

薬物動態学研究において、CYP 分子種の発現制御に関するメカニズムの解明は古くから興味を持たれ、多くの研究者により様々なアプローチがなされてきた。その中で研究者らの疑問は、「エキソンや 5' 調節領域上に SNP が存在しない同じ CYP 遺伝子型でも個々によって酵素タンパク質の発現量が著しく異なる」という点であった。これまでも、遺伝子のメチル化によるエピジェネティックな発現制御や核内転写因子による制御

などの研究も行われているが、個々の CYP タンパク質発現量を規定する決定的なメカニズムは解明されていない。

本研究では、これまであまり注目されていなかったイントロン SNP にフォーカスして、それらの遺伝子多型によって生じる可能性のあるスプライシングエラーやトランスクリプション効率の変化の有無を、遺伝子の中間産物 mRNA および最終産物である酵素タンパク質を定量することで評価する。

すでに CYP2D6 遺伝子には酵素タンパク質発現量に影響を及ぼすイントロン SNP を含む CYP2D6*41 が報告されている (Toscano et al. Pharmacogenet. Genom. 2006, Ingelman-Sundberg et al. Hum Genomics, 2010)。しかし、それらは白人種に高頻度で存在するが、日本人を含むアジア人種では極めて低頻度でしか存在しない。したがって、日本人種でも白人種で同定されたようなイントロン SNP が、別の領域に存在する可能性が高いと想像する。ただし、このようなメカニズムが存在するか否かを精査するためには以下に示すようないくつかの問題点が存在する。

(1) CYP2D6 遺伝子のイントロン領域は約 3.5kb と長く、200 人分の DNA 検体をダイレクトシーケンス法で解析するためには多額の費用が必要となる。

(2) 酵素タンパク質発現量におけるイントロン SNP の影響を解析するには、cDNA によるタンパク質発現系ではなく、ゲノムを挿入した発現プラスミドによるタンパク質発現系を構築する必要があるが、本当にそのような系で CYP タンパク質が発現可能か判らない。

(3) 仮にイントロン SNP が同定され、*in vitro* でのタンパク質発現系が構築できたとしても、酵素タンパク質の発現量に影響を及ぼす SNP が同定されるとは限らない。

申請者は、(1) の問題について、すべてのイントロン領域をダイレクトシーケンスするのではなく、Denaturing HPLC により SNP の存在する検体のみを選別することで解析費用のコストダウンを図った。また、(2) に関しては、すでに予備実験により、CYP2D6 のエキソン-イントロンをすべて含むゲノム領域を哺乳動物発現ベクターに挿入し、COS-7 細胞にトランスフェクションすることで CYP2D6 タンパク質が発現する系を確立している。さらに、(3) に関しては、本補助金の特性が挑戦的萌芽研究であることから、ポジティブな結果が出るとは限らない本研究テーマに適していると考えた。

2. 研究の目的

これまでに CYP2D6 の SNP 解析は数多く報告されてきたが、イントロン SNP に関するものは非常に少ない。さらに CYP2D6 の SNP 頻度や位置には人種差が存在するため、白人種のデータを直接外挿することはできず、日本人集団独自の解析が必要になる。申請者らはすでに Denaturing HPLC を用いたハイスループット SNP スクリーニング系および cDNA ではなくゲノム挿入発現プラスミドで酵素タンパク質を発現する系を予備実験で構築している。このような系でイントロン SNP の影響を評価している報告はほとんど存在しない。本研究で得られるイントロン SNP の情報をエキソンやプロモーター SNP の情報と組み合わせて総合的な薬物代謝酵素活性の予測系が構築できれば、個々の薬物動態、薬効、あるいは副作用をゲノム情報から推測することが可能となり、より安全で効果的なテーラーメイド薬物療法へと発展できる。

仮に、本研究により CYP2D6 遺伝子のイントロン上に特定の SNP が存在してスプライシングエラーやトランスクリプション効率の変化が起こり、CYP2D6 タンパク質の発現量が変わることが見出されれば、これまでに明らかではなかった薬物代謝酵素の発現量に個人差が生じるメカニズムの一部が解明される。このエビデンスを基に代謝効率を予測するシステムが構築できれば、薬物治療の最適化と安全性を国民に提供できるだけでなく、使いにくい薬を使いやすい薬に変える方法にもなる。

特に、CYP2D6 は小児の注意欠陥/多動性障害 (AD/HD) の治療薬であるアトモキセチンの代謝酵素であり注目度が高い。これまでに、CYP2D6 の代謝遅延型遺伝子多型を有している患者では、野生型遺伝子を有している場合と比較してアトモキセチンが過剰投与となり副作用が生じる可能性が高くなることが報告されている。米国ではすでに医薬品添付文書に「CYP2D6 の遺伝子多型に応じて投薬量を加減するように」というファーマコゲノミクスに関する注意書きが記載されている。しかしながら、CYP2D6 活性の個人差はエキソン領域の遺伝子多型のみでは説明できないため、現時点での CYP2D6 遺伝子多型診断による投与量調節の精度は非常に低い。

本研究では、日本人由来 DNA196 検体における CYP2D6 遺伝子のイントロン SNP をスクリーニングし、ゲノム挿入発現プラスミドを用いた酵素タンパク質発現・定量系により、CYP2D6 の発現量がイントロン SNP により影響を受けるか否かを解析した。

3. 研究の方法

CYP2D6 遺伝子上のイントロン SNP が mRNA

やタンパク質発現量に影響を及ぼすか否かを明らかにし、薬物動態個人差の原因を解明する足がかりとするために、本研究計画では以下の研究項目を行った。

(1) Denaturing HPLC を用いた CYP2D6 イントロン SNP スクリーニング

ヒトの主要な薬物代謝酵素である CYP2D6 は遺伝子完全欠損型の変異アレルを有することが報告されているため、まず、すでに採取してある 196 人分の日本人 DNA サンプルを鋳型として、各サンプルについて long PCR 法を用いた遺伝子完全欠損型変異アレルの確認を行った。次に、CYP2D6 は塩基配列のホモロジーが高い偽遺伝子を有しているため、CYP2D6 遺伝子の特異的に増幅する 1 次 PCR を行う。ここで得られる増幅産物を鋳型とし、CYP2D6 の 9 つのイントロン領域を特異的に増幅するプライマーを設計し、2 次 PCR 増幅した。得られた産物はアガロースゲル電気泳動にてシングルバンドであることを確認した。次にトランスゲノミクス社 Denaturing HPLC WAVE3500 付属の解析ソフト WAVE MAKER を用いて解析に最適な部分変性温度を決定し、ハイスループット SNP 検出を行う。SNP が存在しない場合、産物のピークは 1 本であるが、SNP が存在する場合は部分変性温度でヘテロデュプレックスを形成しピークが 2~4 本形成された。

(2) CYP2D6 イントロン SNP のシーケンス解析

SNP の存在が疑われたサンプルについて、蛍光ジデオキシ法を用いたシーケンス反応を行い、マルチキャピラリー型 DNA シーケンサーを用いて、その詳細な塩基配列を決定した。

(3) イントロン SNP を含む CYP2D6 のハプロタイプ解析

DHPLC やシーケンス解析によって得られる情報は単独の SNP 情報でしかない。同一検体から複数の SNP が検出された場合、対立遺伝子のどちらにそれらの SNP が存在するかをハプロタイプ解析する必要がある。CYP2D6 に関してはオープンリーディングフレームを含む領域が約 5kb 程度であるため、long PCR を行うことにより、ゲノム DNA から容易にクローニングが可能である。得られた PCR 産物をクローニングベクターにライゲーションし、大腸菌にトランスフォームした後、抗生物質に対する耐性選択により単一クローンを得た。複数のコロニーをピックアップし、インサートされたそれぞれのアレルをシーケンス解析することにより、検出された SNP がどちらのアレルに位置するかを確認した。

(4) エキソン-イントロン領域を含む CYP2D6 遺伝子の in vitro 発現系の構築

エキソン-イントロン領域を含む CYP 2D6 遺伝子を哺乳動物発現用ベクターにサブクローニングし、サル腎由来 COS-7 細胞中に CYP2D6 タンパク質を発現させた。方法としては、CYP2D6 イントロン領域に SNP が検出されたヒトゲノム DNA を鋳型として、約 5kb の CYP2D6 遺伝子全長を High Fidelity DNA Polymerase により PCR 増幅した。得られた PCR 産物を哺乳動物発現用ベクター pcDNA-DEST40 に乗せ換え、CYP2D6 発現プラスミドとした。通常は CYP2D6 cDNA を発現プラスミドにクローニングするが、今回の研究ではイントロン領域の SNP が CYP2D6 タンパク質の発現量に影響を及ぼすか否かを解析するため遺伝子全長を挿入した。

(5) CYP2D6 mRNA および CYP2D6 タンパク質発現量の比較

COS-7 細胞に発現させた CYP2D6 タンパク質を定量し、イントロン上 SNP の存在により発現量が増加するか否かを精査した。COS-7 細胞を破碎後、遠心法によりミクロソーム画分を調製する。得られたタンパク質を SDS-PAGE により分離後、抗 CYP2D6 抗体を用いたウェスタンブロットによりその発現を確認した。すでにタンパク質当たりのモル数が判っている市販の CYP2D6 パキュロソームをスタンダードとして検量線を引き定量を行った。なお、発現ベクターのトランスフェクション効率の補正は β ガラクトシダーゼ遺伝子を挿入した発現ベクターを共トランスフェクションして行った。

4. 研究成果

日本人における CYP2D6 遺伝子のイントロンの SNP 解析のため、CYP2D6 野生型 (CYP2D6*1) を有する 190 人の日本人から抽出したゲノム DNA について、イントロン 1~8 を PCR 増幅した。その後、DHPLC による SNP スクリーニングを行い、多峰性ピークが確認された検体についてシーケンス解析を行った。その結果、イントロン 1 において 352T>C および 456C>T、イントロン 2 において 1433C>T、1558G>T および 1583G>C、イントロン 3 において 1786C>T、イントロン 4 において 2086G>A、2157G>T および 2245C>T、イントロン 7 において 3356G>A、イントロン 8 において 3986G>A の計 12 種類の新規 SNP を検出した。その他、27 種の既知 SNP を同定した。その後、これらの SNP スクリーニングサイトに影響を及ぼす可能性があるか否かを In Silico で予測した。その結果、1583G>C および 1598A>G を有するアレルにおいて、イントロン 2 のアクセプターサイトで機能変化がおこる可能性が示唆された。また、

この SNP を含む 4 種のバリエーションハプロタイプを哺乳動物発現用ベクターにサブクローニングし、サル腎由来 COS-7 細胞中に CYP2D6 タンパク質を発現させた。通常は CYP2D6 cDNA を発現プラスミドにクローニングするが、今回の研究ではイントロン領域の SNP が CYP2D6 タンパク質の発現量に影響を及ぼすか否かを解析するため遺伝子全長を挿入した。CYP2D6 タンパク質の定量に関しては、COS-7 細胞を破碎後、遠心法によりミクロソーム画分を調製した。得られたタンパク質を SDS-PAGE により分離後、抗 CYP2D6 抗体を用いたウェスタンブロットによりその発現を確認した。その結果、陽性コントロールである CYP2D6*41 (2988G>A) において、野生型である CYP2D6*1 と比較して 35% の発現低下が認められた。それに対して、今回、新規に同定した 4 種類のバリエーション遺伝子では野生型と同程度の発現量であった。今後は、さらに解析数を増やすことで新規のイントロン SNP が同定されることが予想され、今回確立した CYP2D6 遺伝子挿入プラスミドによるタンパク質発現量評価系で CYP2D6 発現量の個人差に関わるメカニズムが明らかにされる可能性がある。

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 5 件)

1. Masahiro Hiratsuka. *In vitro* assessment of the allelic variants of cytochrome P450. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27, 68-84 (2012), URL=<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22041138> (査読有)
2. Irena Loryan, Marja Lindqvist, Inger Johansson, Masahiro Hiratsuka, Ilse van der Heiden, Ron HN van Schaik, Jan Jakobsson, Magnus Ingelman-Sundberg. Influence of sex on propofol metabolism, a pilot study: implications for propofol anesthesia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 68, 397-406 (2012)
DOI=10.1007/s00228-011-1132-2 (査読有)
3. Masashi Honda, Yuka Muroi, Yuichiro Tamaki, Daisuke Saigusa, Naoto Suzuki, Yoshihisa Tomioka, Yoichi Matsubara, Akifumi Oda, Noriyasu Hirasawa, Masahiro Hiratsuka. Functional characterization of CYP2B6 allelic variants in demethylation of anti-malarial artemether. *Drug Metab. Dispos.*, 39,

1860-1865 (2011)
DOI=10.1124/dmd.111.040352 (査読有)

4. Yuichiro Tamaki, Tomio Arai, Haruhiko Sugimura, Takamitsu Sasaki, Masashi Honda, Yuka Muroi, Yoichi Matsubara, Shuichi Kanno, Masaaki Ishikawa, Noriyasu Hirasawa, Masahiro Hiratsuka. Association between cancer risk and drug metabolizing enzyme gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) polymorphisms in Japanese cases of lung cancer. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 26, 516-522 (2011)
URL=<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21791872> (査読有)
5. Yuichiro Tamaki, Masashi Honda, Yuka Muroi, Tomio Arai, Haruhiko Sugimura, Yoichi Matsubara, Shuichi Kanno, Masaaki Ishikawa, Noriyasu Hirasawa, Masahiro Hiratsuka. Novel single nucleotide polymorphism of CYP2A13 gene in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 26, 544-547 (2011)
URL=<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21606606> (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. 平塚真弘、ファーマコゲノミクス解析による個別化薬物療法の推進、第 22 回日本医療薬学会年会、2012 年 10 月 28 日、新潟
2. 平塚真弘、遺伝子多型情報に基づく薬物代謝酵素バリエーションの酵素反応速度論的機能解析、日本薬学会東北支部第 10 回医療系薬学若手研究者セミナー、2011 年 9 月 17 日、東北大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

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

高橋 亜希 (Takahashi Aki)
東北大学・大学院薬学研究科・助手
研究者番号：30545695