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

平塚真弘^{*1,2,3}

東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野¹, 東北大学病院薬剤部²
東北大学東北メディカル・メガバンク機構³

Pharmacogenomics in Personalized Drug Therapy

Masahiro Hiratsuka^{*1,2,3}

Laboratory of Pharmacotherapy of Life-Style Related Diseases,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University¹,
Department of Pharmacy, Tohoku University Hospital²,
Tohoku Medical Megabank Organization, Tohoku University³

〔 Received November 2, 2012 〕
〔 Accepted March 26, 2013 〕

Drug responses and adverse side effects vary widely among individuals. Researchers have focused on genetic polymorphisms that encode drug-metabolizing enzymes, drug transporters, and drug receptors, as the chief causes of the variations in drug responses. Personalized drug therapy involves analysis of genetic polymorphisms associated with drug responses before drug administration and the selection of drugs and doses according to individual genetic backgrounds. Establishment of personalized drug therapy is expected to contribute to medical economy through avoidance of wasteful drug administration. For the promotion of such medical practice, the use of simple genetic testing that is clinically convenient is necessary. Currently, genetic testing using real-time polymerase chain reaction is frequently employed in laboratories and its clinical application is expected. Regarding the many genes involved in drug responses, to date, the application of patient genetic information to personalized drug therapy has been achieved at a practical level. Information on pharmacogenomics will be critical in medical practice in the near future.

Key words — pharmacogenomics, genetic polymorphism, single nucleotide polymorphism, personalized drug therapy, genetic testing

緒 言

薬物療法において、投与薬物の体内動態、効果の強弱、副作用の発現率には著しい個人差があり、それらを規定している因子は肝機能、腎機能、心機能、年齢、性別、サーカディアンリズム、食事、併用薬、健康食品など様々考えられる。近年、それらの要因の1つとして遺伝子多型が注目されている。特にヒトゲノム上の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) は、薬物感受性に対する様々なバリエーションを生み出している

と考えられている。たった1カ所の塩基配列の違いで、最高薬物血中濃度が通常に比較して数倍から数十倍にまで上昇する場合や、予期せぬ重篤な副作用が高頻度で起こる場合がある。現在では、このようなファーマコゲノミクス情報を利用し、患者個々に対して、より安全で効果的な個別化薬物療法の展開が期待されている。

もし、薬物投与前に患者のゲノム情報を調べて、その患者に最適な薬物の種類、投与量、投与タイミングなどが予測できれば、最小限の薬物量で最大限の効果が得られ、しかも副作用は最小限に抑

* 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-3

えることができると考えられる。このような医療が実際に展開されれば、これまで試行錯誤で行われてきた奏功薬物選択時の非効率性や副作用発現の対症療法で使用されてきた薬物使用状況が大きく変化することが予想されるため、医療経済的なベネフィットも大きいと考えられる。これまで、薬物代謝酵素、薬物トランスポーター、薬物受容体などの薬剤反応性に影響する様々な遺伝子多型が報告され、その一部は薬物動態や薬効と関連することが明らかになっている。

将来、ファーマコゲノミクス情報を利用した個別化医療が展開されるうえで、簡易迅速な遺伝子多型診断法の開発が重要と考えられる。特に外来患者が対象の場合は、遺伝子診断のオーダーが出てから数十分～数時間以内で結果を臨床医に返さなければ、その日の処方にゲノム情報を活用できない。近年、リアルタイム PCR を利用して、薬剤反応性に影響する様々な遺伝子多型を約 30 分～2 時間で検出できる系も数多く開発されている。

ここでは、ファーマコゲノミクス解析と個別化薬物療法に関する様々な知見を紹介する。

ファーマコゲノミクスの研究対象

1. Cytochrome P450

薬物の代謝には多くの酵素がかかわっているが、基質となる医薬品の数が多いという点で Cytochrome P450 (CYP, P450) が最も重要な薬物代謝酵素と言える。CYP は多数の分子種からなるスーパーファミリーを形成しており、ヒトの薬物代謝にかかわるものだけでも 20 種類近くが存在する。これらの分子種の中で医薬品の代謝に最も重要な役割を果たしているのは CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6, CYP1A2 の分子種であり、CYP による医薬品の代謝の 90% 以上がこれらの分子種によるものとされている。これらの分子種は遺伝的多型性を示すことが知られているが、特に CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 については薬剤反応性と遺伝子型との相関性を示す報告が多い。¹⁾

CYP の表現型は正常な代謝能を示す Extensive Metabolizer (EM) と低い代謝能を示す Poor Metabolizer (PM) に大別される。PM は活性低下

を伴うバリエーションアレルを双方の対立遺伝子に持ち、常染色体劣性遺伝する。さらに PM と EM の中間の代謝能を示す Intermediate Metabolizer (IM) と、EM よりも著しく高い代謝能を示す Ultrarapid Metabolizer (UM) に分類されている。

1.1 CYP2D6

CYP2D6 の場合、白人種の 7% 程度がこの酵素活性をほとんど持たない PM である。PM の頻度には人種差が存在し、日本人を含むモンゴル人種における CYP2D6 の PM の頻度は 1% 以下である。PM では種々の薬物の代謝が遅延しており、同じ量の薬物が投与されても、通常より高い血漿中濃度が長時間続くため、副作用が出やすくなる。例えば、CYP2D6 の PM の場合、基質薬物となる三環系抗うつ薬による不整脈や口渇の副作用が出やすいことが知られている。CYP2D6 の遺伝子型は現在までに 100 種以上が報告されているが、これらのバリエーションアレルのうち、白人種の PM の主要な原因となる遺伝子型は、*CYP2D6**3, *CYP2D6**4, *CYP2D6**5 である。これら 3 種のバリエーションにより白人種の PM の 90% 以上が説明可能とされている。また、CYP2D6 の代謝能が低下するが PM ほどではない IM の原因となる遺伝子型 (*CYP2D6**10) の存在も明らかにされている。この遺伝子型は日本人や中国人にきわめて多い。近年、乳がん治療薬タモキシフェンの薬剤感受性と CYP2D6 遺伝子多型に関する研究報告が相次いでいる。

タモキシフェンは、エストロゲン受容体陽性の乳がん患者に対して、手術後のホルモン補助療法に用いられる。特に、閉経前の乳がん患者においては、第一選択薬として投与される。タモキシフェンは主に薬物代謝酵素である CYP3A4/CYP3A5 および CYP2D6 によって代謝され、タモキシフェンより抗エストロゲン効果が 30～100 倍強い 4-水酸化タモキシフェンとエンドキシフェンに変換される。エンドキシフェンは 4-水酸化タモキシフェンに比べ、血中濃度が約 10 倍高く、エンドキシフェンが抗エストロゲン作用の中心をなすと考えられている。^{2,3)} 2006 年に Goetz らにより、CYP2D6 の PM (*CYP2D6**4/*4) 患者では EM に比べ、タモキシフェン投与後の無再発期間が有意に

短く、無再発生存率も低いことが報告された。⁴⁾ また、CYP2D6 遺伝子多型には人種差が存在しており、アジア系人種は一般的に白人よりも CYP2D6 活性が低く、その原因として *CYP2D6*10* の頻度が高いことが挙げられる。日本人乳がん患者 67 人のうち、*CYP2D6*10/*10* は 15 人に認められ、これらの患者では無再発生存率が CYP2D6 野生型と比較して劣っていた (ハザード比 = 10.04, 95% CI = 1.17~86.24, $P = 0.036$)。⁵⁾ さらに、韓国人のタモキシフェン服用患者 202 人中、*CYP2D6*10/*10* を有する患者においては、野生型である CYP2D6 野生型の患者に比べエンドキシフェンの血中濃度が低く、無再発期間が有意に短かった (5.0 vs 21.8 カ月 $P = 0.0032$)。⁶⁾ 従って、*CYP2D6*10/*10* の乳がん患者では、血中エンドキシフェン濃度が低くなり、十分な治療効果が得られていない可能性がある。また、これまで *CYP2D6*10* アレルは IM 型のバリエーションアレルと考えられてきたが、基質薬物の種類によっては PM 型アレルに近い無活性となることが予想される。

1.2 CYP2C9

CYP2C9 は抗てんかん薬フェニトインや抗凝固薬ワルファリンの代謝反応を触媒している。現在までに報告されている CYP2C9 のバリエーションアレルは 50 種以上にのぼる。その中でも *CYP2C9*3* は COS 細胞および酵母を用いた発現系、あるいは遺伝子型が同定された健康人および患者を対象とした *in vivo* 試験により活性の低下が確認されている。例えば、*CYP2C9*3* アレルをヘテロ接合体で有する患者 (*CYP2C9*1/*3*) では (S)-ワルファリンの経口クリアランスは 1/2 以下まで減少し、さらに、*CYP2C9*3* アレルをホモ接合体で有する患者ではクリアランスは 1/10 以下まで減少した。⁷⁾ 最近では、CYP2C9 の遺伝子多型のみならず、ワルファリン応答性の個人差に関係する Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit1 (VKORC1) や CYP4F2 の遺伝子多型も報告されており、⁸⁾ 遺伝子診断の臨床的意義が注目されている。

1.3 CYP2C19

CYP2C19 は抗てんかん薬メフェニトインの S-

水酸化反応を触媒する酵素であり、そのほかにもオメプラゾールをはじめとする一連のプロトンポンプ阻害薬の代謝反応も触媒している。CYP2C19 の日本人における PM の頻度は約 20% であり、白人種では約 3% である。CYP2C19 のバリエーションアレルは現在までに 28 種見いだされているが、日本人の場合、*CYP2C19*2* と *CYP2C19*3* の 2 つのバリエーションアレルで PM のほぼ 100% を説明することができる。オメプラゾールを内服した際の血中のオメプラゾール濃度は CYP2C19 の遺伝子型別に有意に異なり、PM の内服 10 時間後の血中濃度が EM のピーク値に匹敵している。また、24 時間の Area Under the plasma concentration-time Curve (AUC) で比較すると、EM と PM では約 8 倍の違いが認められると報告されている。⁹⁾

2. Cytochrome P450 以外の薬物代謝酵素

2.1 Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)

DPD は抗がん剤である 5-FU 代謝の律速酵素であり、投与された 5-FU の 85% 以上が DPD で代謝されることが知られている。DPD をコードする遺伝子は *DPYD* と呼ばれ、バリエーションアレルは現在まで 13 種類見いだされている。特に DPD 活性の低下に影響を及ぼすバリエーションは、スプライシング認識部位の変異を有する *DPYD*2* であることが報告されている。¹⁰⁾ DPD 活性の低い患者に 5-FU を投与することにより白血球減少、口内炎、下痢、嘔気嘔吐、小脳障害などの副作用発現率が増大することが知られている。日本人集団で *DPYD*2* アレルは同定されていないため、*DPYD* の遺伝子多型解析のみで 5-FU の副作用予測をするのは現時点で困難である。

2.2 Thiopurine S-methyltransferase (TPMT)

TPMT はチオプリン系薬物をメチル化により代謝的不活化する酵素である。そのため TPMT の酵素活性は細胞毒性を決定する重要な因子となる。1980 年代、TPMT 酵素活性には著しい個人差が存在することが報告された。¹¹⁾ 赤血球中の TPMT 酵素活性は白人種の 0.3% で低活性、10% で中活性、90% が高活性という 3 峰性の分布をとることから、この酵素活性の個人差は TPMT 酵

素活性を欠損あるいは著しく低下させる *TPMT* 遺伝子多型のホモ接合体、ヘテロ接合体および野生型ホモ接合体にそれぞれ対応することが考えられてきた。それらの遺伝子多型は、これまでに *TPMT**1~*28 (*1 は野生型) が報告されている (2012 年 10 月現在)。低活性および中活性群の 80% 以上からは *TPMT**2 (238G>C), *TPMT**3A (238G>C および 460G>A), *TPMT**3B (460G>A) および *TPMT**3C (719G>A) といったバリエーションアレルが検出されている。これらのバリエーションアレルのいずれかをホモ接合体で有する場合、*TPMT* 酵素活性はきわめて低くなる。従って、これらのアレルを有する場合、チオプリン療法で重篤な副作用を発症する可能性が高い。実際、Relling らの報告によると、¹²⁾ 6-メルカプトプリン投与患者において、*TPMT* 活性欠損アレルをホモ接合体で有する場合、副作用による投与量減量発生確率は 100%、ヘテロ接合体では約 35%、野生型ホモ接合体では約 7%にとどまった。また、白人種において *TPMT**3A は 4.5%と、比較的頻度が高いことが報告されている。¹³⁾ しかしながら、上述の 3 種類のアレルを持たない患者においても副作用が発現する点やアジア系人種ではこれらのアレル頻度は 1%程度であるという点などから、¹⁴⁾ チオプリン系薬物の副作用発現にはこれら以外のアレルの関与やほかのチオプリン系薬物代謝酵素の関連も示唆されている。

2.3 N-acetyltransferase 2 (NAT2)

結核治療薬イソニアジドの N-アセチル化能の個人差は、N-acetyltransferase 2 (*NAT2*) 遺伝子の多型性によって起こることが以前から報告されていた。*NAT2* はアセチル化活性により Rapid Acetylator (RA), Intermediate Acetylator (IA), Slow Acetylator (SA) に分類される。SA の頻度は白人種では約 50%であるのに対して、日本人では約 10%である。現在 10 種類以上のバリエーションアレルが見いだされているが、日本人では *NAT2**4 (野生型アレル) 以外の 3 種類の変異アレル (*NAT2**5, *NAT2**6, *NAT2**7) ではほぼ 100% の SA を説明できる。

我々のグループは以前にリファンピシンの併用

のない日本人イソニアジド投与患者 (102 人) に対し、*NAT2* の遺伝子診断を行った。¹⁵⁾ その結果、副作用を発現していたのは 6 人であり、特に *NAT2* の SA 遺伝子型を有する患者では 83.3%に副作用が認められたことを明らかにした。副作用は悪心・嘔吐、発熱、視力障害、末梢神経障害と多岐にわたっていたが、それらの患者についてはイソニアジドの投与を中止あるいは減量することで副作用が消失あるいは減弱させることができた。イソニアジドの副作用はそれほど重篤ではないが、患者の QOL を低下させないためにも、*NAT2* の遺伝子診断は臨床応用されるべきだと考えられる。

2.4 Uridine diphosphate-glucuronosyl transferase 1A1 (UGT1A1)

抗がん剤であるイリノテカン[®]は肝臓内のカルボキシエステラーゼによって、活性代謝物である SN-38 に変換され、その後 UGT1A1 によって、グルクロン酸包合を受け、主に胆汁中から排泄される。*UGT1A1* プロモーター領域の TATA box は野生型では 6 回 TA 繰り返し配列であるが、7 回繰り返しの *UGT1A1**28 アレルが酵素タンパク質の発現量低下をもたらし、結果として下痢や骨髄抑制の副作用発現リスクが上昇することが示されている。¹⁶⁾ *UGT1A1**28 アレルの頻度は、欧米人やアフリカ人 (35~45%) に比べ、日本人では若干低い (10~13%)。しかしながら、アジア人に高頻度で見られる *UGT1A1**6 アレルなどもイリノテカンによる副作用発現と関連性があることが報告されているため、¹⁷⁾ 日本人での *UGT1A1* 遺伝子多型診断の臨床的意義は大きい。

3. 薬物代謝酵素以外の因子

3.1 ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen : HLA)

スティーブンス・ジョンソン症候群 (SJS) や中毒性表皮壊死症 (TEN) など、医薬品による重症薬疹については、発症を予測するバイオマーカーとして HLA の遺伝子多型が注目されている。これまでに、漢民族を祖先に持つ患者を対象として行われた Chung ら¹⁸⁾ および Hung ら¹⁹⁾ の報告において、抗てんかん薬カルバマゼピン服用後に

SJS/TENを発症した例のうち、ほぼ全例が *HLA-B**1502 多型を有していたことが報告されている。しかしながら、日本人集団における *HLA-B**1502 多型の頻度は 1% 以下であり、ほかの多型部位の関与が示唆されていた。最近、Ozeki ら²⁰⁾により行われた解析において、カルバマゼピンによる重症薬疹発症と *HLA-A**3101 の関連性が明らかにされた。その中で、*HLA-A**3101 保因者では非保因者に比較して、カルバマゼピン服用による重症薬疹発症リスクが 9.5 倍高いことを示している。今後は、臨床現場であらかじめリスク遺伝子を有しているかどうかを調べ、医薬品による重症薬疹が起りやすい患者とそうでない患者を区別し、副作用の回避が可能か否かを検討するプロスペクティブスタディにより実臨床への応用が可能になると予想される。

遺伝子診断法

近年の遺伝子診断技術の進歩は目覚ましく、疾患感受性や薬剤反応性などを規定する遺伝子変異や遺伝子多型解析に利用されている。古典的には PCR-RFLP 法や Allele-specific amplification (ASA) 法が SNP の検出に多く用いられてきた。しかし、これらの方法は PCR 増幅後の電気泳動と臭化エチジウムによる染色が必要であり、非常に煩雑な操作が必要となる。そのため、現在ではそれら遺伝子診断法の欠点を補う方法がいくつも開発されている。特に、ここ十年くらいの間で一般的に利用されるようになった方法は、蛍光プローブや蛍光色素を PCR の反応液中に含有させ、経時的に DNA 量を定量したり、特徴的な塩基配列を認識したりする Real-Time PCR である。これらの方法は、DNA 抽出後、約 30~60 分程度で SNP の存在を検出することができる。Real-Time PCR の中でも、特に多くの施設で用いられ、様々な SNP 検出に応用されているのは TaqMan プローブ法と HybProbe 法である。

1. Real-Time PCR

1.1 TaqMan プローブ

TaqMan プローブ法は PCR に用いる TaqDNA ポ

リメラーゼの 5' エキソヌクレアーゼ活性を利用している。TaqMan プローブは 5' 末端にレポーター蛍光色素 (FAM など) を、3' 末端にクエンチャー蛍光色素 (TAMRA など) を標識してある約 20~30 mer のオリゴヌクレオチドである。TaqMan プローブ上の 2 種類の蛍光色素は互いの物理的距離が近い場合、Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 現象により蛍光強度が低下した状態におかれている。しかし、TaqDNA ポリメラーゼの 5' エキソヌクレアーゼ活性により、伸長反応によって蛍光色素結合部分が切断される。その結果、蛍光色素が遊離し、クエンチャーの影響を受けなくなるため、蛍光が検出されるようになる。通常 TaqMan プローブは SNP が中央にくるように設計する。我々のグループは、PCR プライマーの 3' 末端を SNP の位置に置いた ASA 法と Real-Time PCR 法を組み合わせた方法を開発しており、²¹⁾ 簡便かつ短時間で SNP 検出が可能である (図 1 および 2)。この系では TaqMan プローブだけでなく、より安価な SYBR Green の利用も可能である。

1.2 HybProbe

HybProbe 法は、2 つの蛍光標識プローブを用いた PCR 産物および SNP のリアルタイム検出法である。SNP を含む目的の配列を増幅する PCR プライマーを設計する。次にそれらのプライマーを用いて増幅した PCR 産物の配列内にハイブリダイズするような 3' 末端をフルオレセインでラベルしたプローブを設計する。その近傍に 5' 末端を LCR640 蛍光色素で、3' 末端をリン酸基でラベルしたプローブを設計する。SNP の位置はこれらのプローブのどちらかの中心に来るようにする。SNP 検出は融解曲線分析によって行われる。つまり、PCR 終了後、蛍光シグナルをモニターしながら温度をゆっくり上昇させる。ある温度に達すると、まず T_m の低いほうのプローブが解離し、フルオレセインと LCR640 の距離が離れるため、蛍光強度が急激に低下する。つまり、鋳型とプローブ間にミスマッチが存在すると、完全にマッチした配列よりしやすくなるため、SNP の有無が検出できる。

図1 Allele-Specific Real-Time PCR による SNP の検出

(下) SNP を有するアレル (*CYP2C19*2*) に SNP detection primer を用いて反応させた場合は、プライマーの完全なアニーリングにより DNA ポリメラーゼで伸長反応が起こり、その過程で TaqMan プローブが分解されて、5' 端にラベルされていたレポーター蛍光色素 (FAM) がクエンチャー蛍光色素 (TAMRA) を離れて蛍光発光が生じる。

(上) 一方、野生型アレルに SNP detection primer を用いた場合は、プライマーの 3' 端が鋳型 DNA とミスマッチしているため伸長反応が起きず、結果として FRET 現象により FAM の蛍光が生じない。Wild-type (野生型) プライマーを用いた場合はこの逆となる。

A. CYP2C19*1/*1

B. CYP2C19*1/*2

C. CYP2C19*2/*2

図2 Allele-Specific Real-Time PCR による *CYP2C19*2* の検出

横軸は PCR サイクル数を示し、縦軸は蛍光強度を示す。図中の A, B, C は、*CYP2C19*1/*1*, *CYP2C19*1/*2*, *CYP2C19*2/*2* の各増幅プロファイルを示している。

1.3 ほかの Real-Time 法

そのほかにも HyBeacon Probe や 3'Locked nucleic acid primer を利用した Real-Time PCR による SNP 検出法が報告されている。さらに DNA 二重鎖に飽和的に取り込まれる蛍光色素 LC Green を用いた High-resolution melting assay が開発されており、これまで用いられてきた SYBR Green の欠点を補ったものである。また、PCR 法を用いない定温遺伝子増幅法として Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) や SMar Amplification Process version 2 (SMAP2) が開発されている。それらの遺伝子増幅法は高価なサーマルサイクラーを必要とせず、安価なブロックインキュベーターを利用できるメリットがある。しかし、プライマーの設計は PCR に比較して煩雑であり、専用のソフトウェアを必要とする。

2. ほかの遺伝子診断法

そのほかの遺伝子診断法としては、Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC), Pyrosequencing, Invader assay, Luminex assay, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) を利用した Mass Array, SNPstream, DNA Chip, Nano Chip などが研究室レベルで広く利用されている。すでに DNA Chip については、ロシュ・ダイアグノスティックス(株)が CYP2D6 と CYP2C19 の遺伝子多型を判別できる AmpliChip CYP450 をコマーシャルベースで販売している。

3. Point-of-care testing

現在、TaqMan プローブ法、融解曲線分析法、ダイレクトシーケンス法などは研究室レベルで汎用されている遺伝子診断技術である。一方、Pyrosequencing, TOF-MS, DNA chip などの比較的高価な専用機器や専用技術を要するものは、主に受託解析施設やゲノムセンターなどで使われている。今後、個別化薬物療法を臨床現場で実践するうえでは、患者のベッドサイドや診療現場で簡便に遺伝子診断できる Point-of care testing も必要になると考えられる。我々はこれまでに、イムノクロマトグラフィーストリップを利用した Point-

図3 イムノクロマトグラフィーを利用したベッドサイド遺伝子多型診断法

ジゴキシゲニンラベルプライマーとビオチンラベルプローブを用いた PCR により、ミトコンドリア DNA 1555A (野生型) の人では、Wt (野生型) プローブを用いたときにのみ、Detection Line にバンドが出る。それに対し、ミトコンドリア DNA 1555G (多型) の人では、Mt (多型) プローブを用いたときにのみ、Detection Line にバンドが出る。なお、Control line が出れば、イムノクロマトグラフィー反応自体は成功していると判断される。

of care genetic testing を開発してきた。²²⁾ この方法は、PCR 後に反応液をストリップに添加し、SNP が存在するとストリップ上に紫色のバンドが出現することで SNP の有無を視覚的に判断することができる (図3)。PCR 後の検出時間は5分程度であり、簡易迅速に遺伝子多型診断をすることができる。

ファーマコゲノミクス解析の新たなストラテジー

これまでのファーマコゲノミクスマーカーの同定には大きく2つの方法論が存在した。1つは、ある医薬品で血中濃度が異常に高値を示した場合や副作用が発現している患者をリクルートし、その医薬品の代謝パスウェイから主要な薬物代謝酵素やトランスポーターを特定し、それらの遺伝子上に多型が存在するか否かを評価する方法である。もう一方は、数十万～百万カ所の SNP を同定できるマイクロアレイを利用し、同じ医薬品投与で副作用が発現した群としなかった群で頻度に有意に差が出る SNP を検出するゲノムワイドアソシエーションスタディ (GWAS) である。前

者は、解析ターゲットとなる遺伝子群が少ないために、仮説が誤っていればマーカーの発見には繋がらない。後者では、マイクロアレイでカバーされる SNP は比較的頻度が高い既知のものに限られるため、酵素活性の劇的な低下や発現量に影響するような低頻度の SNP を見逃してしまう。これらの解析方法の欠点を補う方法としては、患者一人一人の全ゲノム DNA をシーケンスし、副作用発現群と非発現群、あるいは薬物の高血中濃度群と低血中濃度群で有意な頻度分布の偏りを示すような SNP を同定することが考えられる。近年、次世代シーケンサーの登場により比較的短期間に全ゲノムシーケンスすることが可能になってきている。しかしながら、全ゲノムシーケンスの解析コストは現時点で非常に高く、多検体を解析するためには多額の費用を要する。それに対して、薬物動態制御に関連する特定の遺伝子群をマルチプレックスに PCR 増幅し、そのアンプリコンのみを次世代シーケンサーで解析（ターゲットリシーケンス）すれば、解析コストを大幅に縮小することができるだけでなく、医薬品の反応性に影響する複数の薬物代謝酵素やトランスポーター遺伝子のエキソン、イントロンおよびプロモーター SNP を網羅的かつ包括的に同定することができる。この手法で得られた SNP 情報を基に、薬物動態、薬効、あるいは副作用発現の個人差を比較できれば、個別化薬物療法で有用な新規ファーマコゲノミクスマーカーが数多く同定される可能性が高い。

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例

ミトコンドリア DNA の 12S rRNA 遺伝子内にある 1555 番目の A > G 多型を有しているヒトでは、ストレプトマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質の投与により不可逆的感音性難聴になりやすいことが 1993 年に報告されている。²³⁾ 本来、アミノグリコシドは細菌選択的なタンパク合成阻害作用を有するが、ヒトミトコンドリア 1555 番目の塩基が A から G に置換するとバクテリアの 16S rRNA の立体構造と類似するため、本来親和

性のなかったこの部位がアミノグリコシド系抗生物質の結合部位となり、ミトコンドリア電子伝達系と酸化的リン酸化に関与するタンパク質の合成が阻害される。この結果、細胞内の ATP 産生が低下し、特に内耳有毛細胞ではその機能が大きく障害されると考えられている。

我々のグループは東北大学病院遺伝科（松原洋一教授）と連携して、遺伝カウンセリングとミトコンドリア DNA 遺伝子多型診断による副作用発現の予防的対処に関する臨床応用を行ってきた。²⁴⁾ 東北大学病院遺伝科で遺伝カウンセリングを希望した患者（母親および長男）について、遺伝子解析に対する説明と同意を得た後、ミトコンドリア DNA 1555A > G 多型の遺伝子診断を行った。また、この患者からの聞き取り調査により、家系内での難聴発症者を示す家系図を作製した。相談者（母親）の兄弟にあたる男性の配偶者（相談者とは血縁関係なし）も受診を希望したため、本人と長女、次女、三女 4 名についても同様にカウンセリングと遺伝子多型診断を行った。その結果、家系図より難聴発症者はミトコンドリア DNA 1555A > G 多型が原因と考えられる母系遺伝様式が認められた（図 4）。また、遺伝子多型診断により 2 家族 6 名の親子すべてにおいてミトコンドリア DNA 1555A > G 多型を有していることが判明した。これらの患者に対し、将来的にアミノグリコシド系抗生物質が投与されないように副作用予防薬剤カードを作成し、それを携帯するように指導して個化副作用予防を行った。この症例は遺伝カウンセリングと共にファーマコゲノミクス情報を利用した遺伝子多型診断を協調的に行うことで、将来、患者に高率で起こり得る薬剤性副作用の回避に貢献できたケースである。この臨床応用は現在も継続して実施している。

ミトコンドリア DNA 1555A > G 多型を有するヒトの頻度は人種に関係なく 200~400 人に 1 人と推定されている。現在もアミノグリコシド系抗生物質は主に重症感染症病棟や新生児 ICU 等で使用され、ほかの抗生物質よりも使用頻度は低いが、なくてはならない医薬品である。ミトコンドリア DNA 1555A > G 多型を有するヒトの場合、ワンショットのアミノグリコシド投与のみで高度

図4 ミトコンドリア DNA 1555A>G 多型を有する難聴患者の家系図
難聴を発症している患者は、過去にアミノグリコシド系抗生物質の投与があった。難聴患者はすべて母系遺伝形式で発症しており、ミトコンドリア DNA の遺伝子多型が疑われた。遺伝子診断の結果、ミトコンドリア DNA 1555A>G が検出された。

の感音性難聴が発症するケースは否定できない。しかも、それは非可逆的であり、患者の QOL を著しく低下させる。技術的には、ミトコンドリア DNA 1555A>G の遺伝多型診断はゲノム DNA 上の SNP 診断と何ら変わりない。基本的には 1555A 型か 1555G 型の 2 つに分類されるので、ヘテロ接合体が存在するゲノム DNA の遺伝子型よりも、むしろ解釈が明確である。現在の遺伝子解析のコストは 10 年前に比べて 10~100 分の 1 くらいになっているため、コストに対するベネフィットは十分大きいと判断できる。このようなファーマコゲノミクス解析を薬物投与前に積極的に行うことで、薬剤性副作用を予防することができ、国民医療に大きく貢献できると考える。

結 語

実際のところ、日本国内でファーマコゲノミクス解析の臨床応用はどの程度進んでいるのであろうか？少なくとも、イリノテカンに関しては 2008 年に添付文書の改訂が行われ、その後、UGT1A1 の遺伝子多型診断薬が保険適用になり、多くの病院でファーマコゲノミクス情報による個別化薬物療法が走り始めている。しかしながら、それ以外の遺伝子に関しては、研究レベルの域を

脱していないのではないだろうか。例えば、CYP2C19 とヘリコバクターピロリ除菌療法やクロピドグレル、CYP2C9、VKORC1、CYP4F2 とワルファリン、CYP2D6 とタモキシフェン、CYP3A5 とタクロリムス、TPMT と 6-メルカプトプリンなどの関連性は、比較的エビデンスレベルが高く、臨床応用が可能であると考えられるが、実際にルーティンで臨床応用している施設はほとんどない。このような臨床応用が進んでいない原因は様々考えられ、前向き臨床試験のエビデンスが不足していることが、その代表であろう。従って、さらなるエビデンス構築のためには、薬学研究者や薬剤師のファーマコゲノミクス研究への積極的な参画が望まれる。また、我々の経験から言えば、病院内で遺伝子多型解析および処方設計支援部門を恒常的に維持するための予算とその人材確保の困難さが、ファーマコゲノミクスの臨床応用を停滞させている原因の 1 つと考えている。特にファーマコゲノミクスに精通した専門薬剤師はまだ少なく、今後の人材育成は重要であると考えている。従来の薬学研究スタイルは、「薬学研究者はベーシックサイエンス」、「薬剤師はクリニカルファーマシー」というようなパターンが多かった。今後は、医療薬学に関連する研究の新たな展開として、薬学研究者は、よりクリニカルファー

マシーを意識し、薬剤師はよりベーシックサイエンスを意識し、お互いの領域に踏み込むような研究スタイル作りが期待される。薬剤師業務を行いながら、研究を行うことがいかに大変であるかは、私自身、身をもって体験した。しかしながら、誰もがやっていない所からイノベーションは生まれるものである。特に、ファーマコゲノミクス研究を行ううえでは、現場の薬剤師が最も優位なポジションにあると実感する。専門分野の異なる薬学者が、お互いの得意分野で情報を交換・共有することは、今後、さらに国民医療に貢献できるような新たな研究分野を切り開くことに繋がると期待している。

引用文献

- 1) Hiratsuka M, Sasaki T, Mizugaki M, Genetic testing for pharmacogenetics and its clinical application in drug therapy, *Clin Chim Acta*, 2006, **363**, 177-186.
- 2) Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, Hayes DF, Desta Z, Flockhart DA, Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine, *J Natl Cancer Inst*, 2003, **95**, 1758-1764.
- 3) Jin Y, Desta Z, Stearns V, Ward B, Ho H, Lee KH, Skaar T, Storniolo AM, Li L, Araba A, Blanchard R, Nguyen A, Ullmer L, Hayden J, Lemler S, Weinshilboum RM, Rae JM, Hayes DF, Flockhart DA, CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment, *J Natl Cancer Inst*, 2005, **97**, 30-39.
- 4) Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C, Couch FJ, Lingle WL, Weinshilboum RM, Fritcher EG, Nibbe AM, Desta Z, Nguyen A, Flockhart DA, Perez EA, Ingle JN, The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen, *Breast Cancer Res Treat*, 2007, **101**, 113-121.
- 5) Kiyotani K, Mushiroda T, Sasa M, Bando Y, Sumitomo I, Hosono N, Kubo M, Nakamura Y, Zembutsu H, Impact of CYP2D6*10 on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy, *Cancer Sci*, 2008, **99**, 995-999.
- 6) Lim HS, Ju Lee H, Seok Lee K, Sook Lee E, Jang IJ, Ro J, Clinical implications of CYP2D6 genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer, *J Clin Oncol*, 2007, **25**, 3837-3845.
- 7) Takahashi H, Kashima T, Nomoto S, Iwade K, Tainaka H, Shimizu T, Nomizo Y, Muramoto N, Kimura S, Echizen H, Comparisons between *in-vitro* and *in-vivo* metabolism of (S)-warfarin: catalytic activities of cDNA-expressed CYP2C9, its Leu359 variant and their mixture versus unbound clearance in patients with the corresponding CYP2C9 genotypes, *Pharmacogenetics*, 1998, **8**, 365-373.
- 8) Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, Eriksson N, Ghorri MJ, Bumpstead S, Holm L, McGinnis R, Rane A, Deloukas P, The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting, *Blood*, 2009, **113**, 784-792.
- 9) Ieiri I, Kubota T, Urae A, Kimura M, Wada Y, Mamiya K, Yoshioka S, Irie S, Amamoto T, Nakamura K, Nakano S, Higuchi S, Pharmacokinetics of omeprazole (a substrate of CYP2C19) and comparison with two mutant alleles, CYP2C19m1 in exon 5 and CYP2C19m2 in exon 4, in Japanese subjects, *Clin Pharmacol Ther*, 1996, **59**, 647-653.
- 10) Wei X, McLeod HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P, Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity, *J Clin Invest*, 1996, **98**, 610-615.
- 11) Weinshilboum RM, Sladek SL, Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity, *Am J Hum Genet*, 1980, **32**, 651-662.
- 12) Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, Pui CH, Evans WE, Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus, *J Natl Cancer Inst*, 1999, **91**, 2001-2008.
- 13) Schaeffeler E, Zanger UM, Eichelbaum M, Asante-Poku S, Shin JG, Schwab M, Highly multiplexed genotyping of thiopurine s-methyltransferase variants using MALD-TOF mass spectrometry: reliable genotyping in different ethnic groups, *Clin Chem*, 2008, **54**, 1637-1647.

- 14) Hiratsuka M, Inoue T, Omori F, Agatsuma Y, Mizugaki M, Genetic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism in a Japanese population, *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen*, 2000, **448**, 91-95.
- 15) Hiratsuka M, Kishikawa Y, Takekuma Y, Matsuura M, Narahara K, Inoue T, Hamdy SI, Endo N, Goto J, Mizugaki M, Genotyping of the N-acetyltransferase2 polymorphism in the prediction of adverse drug reactions to isoniazid in Japanese patients, *Drug Metab Pharmacokinet*, 2002, **17**, 357-362.
- 16) Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, Yokoyama A, Saitoh S, Shimokata K, Hasegawa Y, Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis, *Cancer Res*, 2000, **60**, 6921-6926.
- 17) Minami H, Sai K, Saeki M, Saito Y, Ozawa S, Suzuki K, Kaniwa N, Sawada J, Hamaguchi T, Yamamoto N, Shirao K, Yamada Y, Ohmatsu H, Kubota K, Yoshida T, Ohtsu A, Saijo N, Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: roles of UGT1A1*6 and *28, *Pharmacogenet Genomics*, 2007, **17**, 497-504.
- 18) Chung WH, Hung SI, Hong HS, Hsieh MS, Yang LC, Ho HC, Wu JY, Chen YT, Medical genetics: A marker for Stevens-Johnson syndrome, *Nature*, 2004, **428**, 486.
- 19) Hung SI, Chung WH, Jee SH, Chen WC, Chang YT, Lee WR, Hu SL, Wu MT, Chen GS, Wong TW, Hsiao PF, Chen WH, Shih HY, Fang WH, Wei CY, Lou YH, Huang YL, Lin JJ, Chen YT, Genetic susceptibility to carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions, *Pharmacogenet Genomics*, 2006, **16**, 297-306.
- 20) Ozeki T, Mushiroda T, Yowang A, Takahashi A, Kubo M, Shirakata Y, Ikezawa Z, Iijima M, Shiohara T, Hashimoto K, Kamatani N, Nakamura Y, Genome-wide association study identifies HLA-A*3101 allele as a genetic risk factor for carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions in Japanese population, *Hum Mol Genet*, 2011, **20**, 1034-1041.
- 21) Hiratsuka M, Agatsuma Y, Omori F, Narahara K, Inoue T, Kishikawa Y, Mizugaki M, High throughput detection of drug-metabolizing enzyme polymorphisms by allele-specific fluorogenic 5'nuclease chain reaction assay, *Biol Pharm Bull*, 2000, **23**, 1131-1135.
- 22) Hiratsuka M, Ebisawa A, Matsubara Y, Kure S, Konno Y, Sasaki T, Mizugaki M, Genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) influencing drug response by competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with immunochromatographic strip, *Drug Metab Pharmacokinet*, 2004, **19**, 303-307.
- 23) Prezant TR, JAGapian JV, Bohlman MC, Bu X, Öztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, Shohat M, Fischel-Ghodsian N, Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness, *Nature Genet*, 1993, **4**, 289-294.
- 24) 呉 繁夫, 菅野潤子, 青木洋子, 松原洋一, 平塚真弘, アミノグリコシド系抗生剤による難聴: ミトコンドリア1555A>G変異の遺伝子検査と遺伝相談, 日本小児科学会雑誌, 2005, **109**, 1266-1267.