Pharmacogenomics in antithrombotic therapy

Kaname NAKATANI*

ヒトゲノムの全塩基配列が解読され、ポストゲノム時代と称される現在では、その情報を医療に活用することが期待されている。最も実現に近いと予想されるのが、ヒトゲノム情報に基づく個別化薬物療法である。疾患名で治療薬や治療法を選択する従来の方法から、同じ病名であっても、個人のゲノム情報を参考にして異なる治療薬や治療法を選択する方法に変化しつつある。これらのパラダイムシフトを推進する学問体系が、ファーマコゲノミクス (Pharmacogenomics, PGx: ゲノム薬理学) であり、ファーマコゲノミクス検査 (以下、PGx 検査) は、個々の患者に最適な治療薬・用法・用量の選択を可能にするため、患者個人の遺伝的特徴を診断する検査であるといえる。抗血栓療法の領域においてもファーマコゲノミクスの活用が検討されている。本稿では、抗血栓療法におけるファーマコゲノミクスの現状について解説したい。

Key words: pharmacogenomics, warfarin, personalized medicine

ファーマコゲノミクスの研究の歴史は古く、1960年代には既に論文が見受けられている。しかし、一般の人にも知られるようになってきたのはヒトゲノムプロジェクト完遂後の、いわゆるポストゲノム時代になってからである。実際に臨床の現場に登場してきたのは、米国FDAが抗癌剤イリノテカンの添付文書に薬剤代謝酵素UGT1A1遺伝子多型検査を記載することを認め

* 三重大学医学部附属病院中央検査部・オーダーメイド医療部〔〒 514-8507 三重県津市江戸橋 2-174〕
Central Clinical Laboratory・Division of Personalized Medicine
〔2-174 Edobashi, Tsu, Mie 514-8507, Japan〕
Tel: 059-231-5476 Fax: 059-231-5476 e-mail: nakatani@clin.medic.mie-u.ac.jp

た2005年と、ごく最近の事である。そのために、臨床現場における薬理遺伝学実践の体制はまだ十分なものではなく、研究室内で薬理遺伝学研究が続けられている。このことにより、研究レベルでは解析法がその研究室独自のものが多く、データの精度や値付けで施設間での均一性に問題があった。また、このことは解析者の技術差が出る原因ともなりやすく、実地臨床に採用するには信頼性に問題があると思われる。2番目には解析実施者の多くが研究者であり、研究が終了すると解析への興味が薄れたり、移動したりして、解析実施者がいなくなることがあった。これにより、解析技術の継続性、均一性、あるいは解析そのものの継続性に問題があった。3番目には、研究ではコストパフォーマンスを考慮することが少なかったように思われる。臨床応用するには、「遺伝学的検査に関するガイドライン」にもあるように分析的妥当性（検査法が確立しており、再現性の高い結果が得られるなど精度管理が適切に行われていること）、臨床的妥当性（検査結果の意味付けが十分になされていること）、臨床的有用性（検査の対象になっている疾患の診断がつけられることにより、臨床上のメリットがあること）を兼ね備えた解析法でなければならない。

2. ファーマコゲノミクスとは

薬剤の効果や副作用を予測するには、まず薬剤の作用から考えなければならない。薬剤効果に関わる要因には、薬剤の吸収、輸送、代謝、排泄や薬剤の標的分子など多くのものがあり、これらを調べることで、薬剤効果の予測ができよう。しかし、対費用効果や時間を考えると、実際は網羅的に調べることは難しい。そこで、薬剤血中濃度に関わる因子、特に薬剤代謝酵素の遺伝子多型に着目して薬物血中濃度を予測しようとする試みが主流となっている。つまり、遺伝情報を活用して投与薬剤の効果や副作用の個人差を予測し、個人個人の至適投与量を予測しようというもので、いわゆるファーマコゲノミクスの応用である。ファーマコゲノミクスとは厚生労働省のゲノム用語集により用語の整理がなされ「ゲノム薬理学（Pharmacogenomics : PGx）は薬物応答と関

連するDNA及びRNAの特性の変異に関する研究」と定義されている。この中でも、「薬理遺伝学（Pharmacogenetics : PGt）はゲノム薬理学の一部であり、薬物応答と関連するDNA配列の変異に関する研究」と定義されている。臨床応用するには、遺伝子特性の解析の中では一塩基多型解析が導入しやすいため、薬剤代謝酵素遺伝子多型の基づく薬理遺伝学検査が活用されているのが現状である。

3. ワーファリンの副作用

ワーファリンはビタミンK類似構造のクマリン誘導体で、ビタミンK代謝サイクルを阻害し、肝臓での再利用を抑制することにより、ビタミンK依存性凝固因子の活性化を阻害する。ワーファリンは抗凝固療法の基本的薬剤として高く評価されているものの、薬剤効果や副作用の個人差が大きいため、使い慣れていない医者にとってはやや使い辛いとも言われている。添付文書においても「成人における維持投与量は1日1回1~5mg程度となることが多い。」と投与量の個人差の大きいことが示唆されている。

米国の疾病管理予防センター（Centers for Disease Control and Prevention）に所属するBudnitzらは、2007~2009年の全米電子監視システム有害事象監視プロジェクトによる副作用調査データを用い、65歳以上の高齢者が薬剤による副作用のため救急外来を受診、入院の実態調査を報告した。それによると、副作用のために救急外来を受診する原因薬剤の1位はワーファリンで、2位はインスリンであった¹⁾。受診後入院の原因となった薬剤も、ワーファリン（33.3%）、インスリン（13.9%）、抗血小板剤（13.3%）、経口血糖降下剤（10.7%）の順であり、ワーファリン投与の難しさを示している（図1）。

ワーファリンは過量投与であると、出血傾向を示すことが知られている。ワーファリンの投与量は、プロトロンビン時間（PT-INR値）がモニターされ、用量調節されている。しかし、ワーファリンによる出血リスクは日本人ではINRが2.6以上²⁾、白人では3.7以上で高くなる³⁾との報告があり、遺伝的背景から日本人は欧米人よりワー

図1 Estimated Rates of Emergency Hospitalizations for Adverse Drug Events in Older U.S. Adults, 2007-2009

ファリン感受性が高いと考えられ、欧米よりは目標 INR が低く設定されている場合が多く、日本人独自の投与量設定が必要であると考えられる。また、出血傾向という副作用が出現すると、主治医は直ちに投与量を極端に減らしてしまうという報告もある。このため、PT-INRなどを測定しながらワーファリン投与量の調整をしているにもかかわらず、副作用を怖がるばかりにその患者に必要な量が投与されていない可能性も指摘されている。患者個人個人に見合った投与量を科学的根拠から設定でき、安心して安全に投与できるための指標を明らかにすることが期待されている。

4. ワーファリンのファーマコゲノミクス

ワーファリンの薬剤効果や代謝の様式を図2に示した。薬理活性の高いS体ワーファリンをほぼ専一的に代謝するチトクローム P450 (CYP) 2C9の代謝活性がワーファリン血中濃度、薬理作用に影響を与えることがよく知られている。CYP2C9には遺伝子多型が存在し、数十種類の変異アレルが報告されているが、*1アレル(野生型)、*2、*3アレル(変異型)がほとんどである。このアレル頻度には人種差が認められ、日本人では、*2アレルは認められず、代謝活性を有する*1アレルと、代謝活性の極めて低い*3アレルの組み合わせということになる。このため、*1のホモ接合体は代謝活性が強く、これを有す

図2 ワルファリンの作用

る人ではワーファリンが代謝されやすいため、薬剤血中濃度が上昇しにくく、薬剤効果が減弱されてしまう。逆に、*1/*3のヘテロ接合体、*3のホモ接合体になるに従い、代謝活性が減弱するため、血中濃度が上昇し、ワーファリン作用が強くなる。しかし、CYP2C9のワーファリン作用への寄与率は15%程度と考えられていること、日本人での*3アレル頻度が2~3%と低いことから、これだけではワーファリン投与量を予測することは難しいと考えられた

その後、ワーファリンの標的酵素である vitamin K epoxide reductase (VKORC1) の遺伝子塩基配列が発表された翌年の2005年、AndreaらはVKORC1のイントロン1領域の1173位における遺伝子多型(1173C>T)がワーファリン投与量に関係することを報告した⁴⁾。さらに同

年, Rieder らは欧米人を対象とした試験において 1173 位を含む複数のノンコーディング部位における SNPs を見出し, これらの多型をある組み合わせで持つハプロタイプは有意にワーファリンの維持量の少ないことを報告した⁵⁾. つまり, VKORC1 は 4 種類のハプロタイプを有し, *1 アレル (野生型) ではワーファリン感受性が低い. ため, 投与量を増やす必要があることがわかってきた. VKORC1 のワーファリン作用への関与は 25% であると報告されていること, 日本人では *1 アレル頻度が 10% 程度あり, この解析は日本人にとって有用であると考えられている.

5. ファーマコゲノミクスの実践

2007 年, 米国 FDA は, ワーファリン投与の際には CYP2C9, VKORC1 の遺伝子解析をして, 投与量を決定することを推奨した. さらに, 添付文書の中でワーファリンと同じ CYP2C9 で代謝されることの多い NSAIDs, SU 剤や抗てんかん剤の併用に注意するように求めていることは注目される. 我が国でも, 2007 年 9 月の医薬品安全情報 (国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部) で, FDA の添付文書改訂の報告がなされている. その中では遺伝情報を用いてワーファリンの初回量の決定に用いられることが期待されている.

では, どのように活用するのであろうか. ワーファリンの導入法にはいくつかの方法がある. 初めから常用量に近い投与量を数日続け, 凝固能をみながら維持量を決定する Daily dose 法, 1 日投与量 1mg から開始する外来導入法, 初回に大量 (15 ~ 30mg) を投与し, 数日おいて凝固能を測定し, その結果から維持量を決定する Loading dose 法がある. 病態や個人的素因などで異なるが, 欧米で推奨される PT-INR 値は, 機械弁置換例のハイリスク群, 及び心筋梗塞の二次予防における 2.5 ~ 3.5 を除いて 2.0 ~ 3.0 の治療域が一般的である. したがって, 維持投与量に達するまでやや時間を要することになり, この間に副作用発現のリスクが生まれる.

ワシントン大学のホームページ⁶⁾では, γ -グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX), CYP4F2 を加えた 4 種類の遺伝子多型や年齢, 性別などか

らワーファリン維持投与量を予測するプログラムを公開している. しかし, 薬剤効果に人種差があるのは, 遺伝的人種差があるためだと考えられており, 米国人の報告をそのまま我が国に導入することはできない. このため, 我々は日本人のデータを元にして, ワーファリン投与プログラムを構築する必要があると考えている.

ワーファリン投与量の設定を, 患者個人個人の差を利用した科学的根拠に基づき, ワーファリンを使い慣れていない医者でも安全にかつ安心して使用可能にする日本人に適したプログラムが様々な検討されている. つまり, 患者の年齢, 性別や体型といった身体計測的個人差に加え, ワーファリン作用に関連する酵素活性の個人差を診断し投与量を決定する予測式の臨床的有効性の確立が急がれている. 我々の施設でも, 患者年齢, 身長, CYP2C9 および VKORC1 遺伝子多型と治療目標プロトロンビン時間からワーファリン維持投与量の予測式を作成し検討している. こういった予測式の臨床的有用性が実証されることにより, ワーファリン治療に慣れていない医者も, 予測式に従って, 科学的根拠を持って投与できることが期待される.

FDA が添付文書の改訂を行ったことは, 保険にも大きな影響を与えた. 複数の健康保険会社が, ファーマコゲノミクス検査をカバーするようになった. 例えば, 米国の公的医療保険制度である Medicare は, 抗血栓薬ワーファリン投与を現在受けている, または予定している患者に対して CYP2C9 または VKORC1 遺伝子検査の費用を負担している. 本邦でも, 保健償還されるようになることが期待されている.

6. 抗血小板薬のファーマコゲノミクス

抗血小板薬のクロピドグレルについても, 多くの報告がなされるようになった. クロピドグレルは, 体内で CYP2C19 によって活性代謝物となり, 血小板表面に発現する P2Y₁₂ 受容体に結合することで, 血小板の凝集を抑制する. これまで, CYP2C19 の遺伝子多型がクロピドグレルの低反応に関与するとの研究成果が蓄積されてきている. CYP2C19 の遺伝子多型は 20 種類以上もあ

るが、日本人では exon5 と exon4 に存在する一塩基多型を有する CYP2C19*2 アレルと CYP2C19*3 アレルの 2 つの組み合わせでほぼ 100% 説明可能と考える。そして、が代謝活性を有する野生型アレルの*1 と変異型アレルの*2, *3 の組み合わせにより extensive metabolizer (EM:*1/*1) と intermediate metabolizer (IM:*1/*2 or *1/*3), poor metabolizer (PM:*2/*2, *2/*3, *3/*3) に分類される。本邦 1002 人で調べたところ、その頻度は EM が 32%, IM が 50% (*1/*2:35%, *1/*3:15%), PM が 18% (*2/*2:9%, *2/*3:8%, *3/*3:2%) であった。つまり、EM ではクロピドグレルが代謝されやすく、活性化されやすいために、薬剤効果が出やすく、PM では薬剤効果が出にくいと考えられる。実際、代謝速度の違いによって、血中濃度に差を生じ、血栓の形成阻害作用に差がみられることが報告されている。代謝機能が上昇している EM が、欧米では約 3% であるように、遺伝子頻度の人種差も確認され、薬剤効果にも人種差があるものと思われる。特に、日本人で検査する意義はより大きいものと考えられる。

FDA は 2010 年 3 月 12 日、クロピドグレルの添付文書に、同薬剤の代謝活性化能が低い患者 (poor metabolizer) に投与した場合は十分な抗血小板作用が得られない可能性があることを警告する boxed warning を追加した。その中では、CYP2C19 遺伝子型を決定することにより、治療戦略が立てやすくなると記載されている。

7. 遺伝子解析法

本稿では一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) に基づくファーマコゲノミクスの実際を示した。これらの遺伝子型の決定法には様々な方法があるが、代表的なものを簡単に紹介する。

1) DNA シーケンス法

DNA 配列を決定することがゴールドেনスタンダードであるが、スループットの点で問題がある。しかし、テーブルトップ型の次世代シーケンサーやショートリードのパイロシーケンサーの普及とともに、より活用されられると思われる。

2) PCR-RFLP 法

抽出した DNA の PCR 増幅産物に制限酵素を作用させ、SNP のタイプにより、増幅産物が切断されるかどうかを電気泳動によって判定する。この方法は、簡便ではあるが、制限酵素の選択性や性能に左右されることが多く、最近ではあまり用いられていない。

3) 一塩基伸長法

検体を PCR 反応で増幅した後、SNP の 1 つ手前の塩基に結合するように設計されたプライマーをこの検体に付ける。次に major タイプと minor タイプの塩基を用意し、プライマーを付けた検体とこの 2 つの塩基をそれぞれ別々にポリメラーゼによる伸長反応させ、どちらの塩基が取り込まれるかを蛍光で判定する。当院でも採用している方法である。

4) Taqman プローブ法

検体を PCR 反応で増幅しながら、major タイプ、minor タイプの 2 種類の SNP を含むプライマーと別々にプローブ反応させ、どちらのプローブが反応するかで判定する。専用の解析装置により増幅過程がリアルタイムに確認でき、検出装置が要らない簡便方法である。

5) インベーター法

PCR 反応を用いずに SNP を検出する方法で、検体に対しミスマッチ部分 (フラップ配列) と SNP 配列を含むシグナルプローブと SNP 部分がオーバーラップするインベーターオリゴを結合させた後、クリベースと呼ばれる特別な酵素を作用させ、シグナルプローブの SNP 塩基が検体配列と同じ時だけ、この酵素でフラップ配列が切断される。切断されたフラップ配列は、シグナルを生成する FRET プローブにインベーターオリゴとなって作用し、蛍光シグナルを検出する。

6) Q プローブ法

Q-プローブ (Quenching Probe) 法は、化学合成した遺伝子断片にある種の蛍光色素を付けておくことで、この断片が標的核酸に結合した際、標的中のグアニン (G) の作用で蛍光が消光し、解離すると一旦消光した蛍光が発蛍光する現象を利用する遺伝子検出・解析法である。このような Q-プローブの性質の内、一旦消光した蛍光が発蛍光する現象を利用することにより、温度解離

曲線から SNP を検出することができる。蛍光色素は遺伝子断片に一つ付加すれば良く、従来の TaqMan 法に比べて設計が容易になることから、使いやすさの点で優れている。複数の全自動解析機で利用されており、安定した解析が期待できる。

7) DNA チップ解析

DNA アレイを用いて、網羅的に解析する方法である。本邦でも、薬事承認を受けた体外診断薬があるものの、技術的、経済的課題より、まだ普及していない。

8. 今後の課題

最近、テーブルトップ型全自動遺伝子解析装置が安価に売りだされ、テーブルトップ型次世代シーケンサーも普及してきた。これらの機器を活用することにより、遺伝子解析の技術的課題は解決されつつある。また、ファーマコゲノミクスの倫理的課題については、日本医学会をはじめとしてガイドライン、運用指針の改訂があり^{8)・10)}、臨床の現場でも臨床検査として活用しやすくなっている。

今後の重要な課題は、臨床的有用性の担保であろう。臨床的有用性を検証する際に問題となるのは、遺伝子型の寄与率であろう。ワーファリンについては、American Medical Association の「Personalized health care report 2008, Warfarin and genetic testing」では、VKORC1 の関与が 25%、CYP2C9 は 15% と遺伝情報で規定されるのは 40% 程度と推定している⁷⁾ (図 2)。その他、年齢、性別や体重の関与を含めても、残り 40% は不確定要素と言われている。これが食事や併用薬などと考えられている。このため、遺伝子型で

投与量を決定することは容易ではない。予測式を用いて投与量を予測しても、うまくコントロールができない場合も出てこようが、その時にはむしろ食生活など患者自身のライフスタイル改善の必要性を指摘できるかもしれない。ファーマコゲノミクス検査をどの様に活用してゆくか、さらに検討が必要であろう。

Disclosure of Conflict of Interests

The author indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Budnitz DS, Lovegrove MC, Shehab N, Richards CL : Emergency Hospitalizations for Adverse Drug Events in Older Americans. *N Engl J Med* **365** : 2002-2201, 2011.
- 2) Yamaguchi T : for Japanese Nonvalvular Atrial Fibrillation-Embolism Secondary Prevention Cooperative Study Group : Optimal Intensity of Warfarin Therapy for Secondary Prevention of Stroke in Patients with Nonvalvular Atrial Fibrillation. *Stroke* **31** : 817-821, 2000.
- 3) Ansell J, Hirsh J, Poller L, Bussey H, Jacobson A, Hylek E : The Pharmacology and Management of the Vitamin K Antagonists. The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* **126** : 204S-233S, 2004.
- 4) D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M : A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* **105** : 645-649, 2005.
- 5) Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, Blough DK, Thummel KE, Veenstra DL, Rettie AE : Effect of VKORC1 Haplotypes on Transcriptional Regulation and Warfarin Dose. *N Engl J Med* **352** : 2285-2293, 2005.
- 6) <http://www.warfarindosing.org/Source/Home.aspx>
- 7) Personalized health care report 2008, Warfarin and genetic testing, American Medical Association.
- 8) 「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」日本医学会 2011 年 2 月
- 9) ゲノム薬理学を適用する臨床研究と検査に関するガイドライン, 日本人類遺伝学会, 日本臨床検査医学会, 日本臨床薬理学会, 日本 TDM 学会, 日本臨床検査標準協議会, 2010 年 12 月
- 10) ファーマコゲノミクス検査の運用指針 : 日本臨床検査医学会, 日本人類遺伝学会, 日本臨床検査標準協議会, 2010 年 12 月

Pharmacogenomics in antithrombic therapy

Kaname NAKATANI *

Key words: pharmacogenomics, warfarin, personalized medicine

Pharmacogenomics is the study of how genes affect a person's response to drugs. This relatively new field combines pharmacology (the science of drugs) and genomics (the study of genes and their functions) to develop effective, safe medications and doses that will be tailored to a person's genetic makeup. Warfarin is the most widely used oral anticoagulant in the world for patients with venous thrombosis, pulmonary embolism, chronic atrial fibrillation, and prosthetic heart valves. However, warfarin is difficult to use because of the wide interindividual variation in dose requirements, the narrow therapeutic range and the risk of serious bleeding. Genetic variants in the cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) were reported to correlate with warfarin sensitivity. Genotyping of CYP2C9 and VKORC1 is a quite useful predictor for warfarin effects and safety.

In this paper, I showed basic pharmacogenomics research and its clinical applications in antithrombic therapy.