学 位 論 文 題 名

ヒト *CYP2D6* の新規遺伝子多型の発見と 遺伝子診断法の確立

学位論文内容の要旨

CYP2D6 は臨床上重要な多くの薬物の代謝にかかわる酵素であるが、日本人では poor metabolizer (PM) のフェノタイプを示すヒトの頻度が低いために、遺伝子レベルでの多型に関する研究はほとんど行われていなかった。本研究は遺伝子診断により日本人における PM の予測率を上昇させることを目的とし、以下の知見を得た。

(1) PM の原因となる *CYP2D6* 遺伝子変異の頻度解析

欧米白人で PM の 90%以上を説明できるとされる *CYP2D6**3、*CYP2D6**4 および *CYP2D6**5 と、当研究室の Yokoi らが日本人 PM より見いだした *CYP2D6**18、中国人 PM より見いだされた *CYP2D6**14、*CYP2D6**14 と同じ位置に塩基置換が存在する *CYP2D6**8 の 6 種類の遺伝子変異の日本人での頻度を解析した。*CYP2D6**3 は 282 名の内、この変異を有している被験者を 1 名も見いだすことは出来なかった。*CYP2D6**4 は 270 名中ヘテロ接合体で変異を有する 4 名を見いだした。*CYP2D6**5 は 256 名を判定した結果、19 名がヘテロ接合体で、1 名がホモ接合体で変異を有していた。*CYP2D6**8 と *CYP2D6**14 は同じ判定法で 226 名判定したが、1 名も変異を有している被験者は見いだせなかった。*CYP2D6**18 は 297 名判定し、ヘテロ接合体で有する 3 名を見いだした。変異の中で *CYP2D6**5 の頻度が最も高く、欧米白人で PM の原因となる最も頻度の高い変異である *CYP2D6**4 の頻度は低く、日本人で PM の頻度が低い一因となることが明らかとなった。これらの変異の頻度から算出された PM の頻度は 0.29%であり、*in vivo* 代謝試験から求められた PM 頻度である 0.84%の約 34%を占めるのみであった。

(2) PM の原因となる未知の *CYP2D6* 遺伝子変異の探索と診断法の確立

前章で検討した 6 種類の遺伝子変異では *in vivo* 代謝試験から求められる PM の約 3 分の 1 しか説明できないことから、これらの遺伝子変異以外に PM の原因となる未知の遺伝子変異が存在すると考えた。そこで、未知の多型を探索する目的で、デブリソキンをを用いて *in vivo* 代謝試験を行い、見いだされた 2 名の PM (PM 1 および PM 2) の *CYP2D6* 遺伝子を解析した。最初に、前章で検討した 6 種類の遺伝子変異を有しているか否かを判定した。PM 1 は *CYP2D6**18 をヘテロ接合体で有していたが、PM 2 は何れの変異も有していなかった。したがって、PM 1 の残り片方の対立遺伝子と、PM 2 の両方の対立遺伝子に、新しい遺伝子変異が存在すると考えられた。そこで、さらに塩基配列を解析した結果、PM の原因と予想される新しい遺伝子変異を 2 種類見いだした。1 つは、エクソン 5 での 1 塩基のシトシン (C₂₆₆₁)

の挿入であり、この変異によりフレームシフトが起こり、挿入箇所の 11 塩基下流でストップコードが生じて、正常なタンパク質が発現されないことが明らかとなった。この新しい変異は国際 P450 命名委員会により、CYP2D6*2I と命名された。この変異は、2 名の PM のどちらにも見いだされた。もう 1 つの変異は CYP2D6*10B を有しておらず、CYP2D6*10C をタンデムに有する新しい遺伝子変異、CYP2D6*10C-10C であった。CYP2D6*10C-10B で活性を有するのは CYP2D6*10B の遺伝子産物である CYP2D6 10A であることが報告されている。したがって、この新規遺伝子変異 CYP2D6*10C-10C では、CYP2D6*10B が存在しないため、活性が消失したものと推測された。以上の結果から、2 名の PM のうち 1 名は CYP2D6*18 と CYP2D6*2I をそれぞれヘテロ接合体で、もう 1 名は CYP2D6*2I と CYP2D6*10C-10C をそれぞれヘテロ接合体で有していることが原因で PM となったことを明らかにした。

次に、新たに見いだしたこれら 2 種類の遺伝子変異を簡便に判定できる方法を確立した。CYP2D6*2I は 2 段階の PCR で判定可能にした。CYP2D6*2I は、健常日本人 318 名における頻度を検討したところ、ヘテロ接合体が 5 名見いだされ、アリル頻度は 0.81% であった。CYP2D6*10C-10C は LA-PCR で判定した。CYP2D6*10C-10C は上述した PM 以外の 2 名の PM では見いだされたが、ランダムに選択した 149 名には見いだすことはできなかつたため、頻度が低いことが予想された。これらの頻度と、前章で明らかにした 6 種類の変異のあわせて 8 種類の変異の頻度より、日本人における PM の頻度は約 0.39% と計算され、この値は *in vivo* 代謝試験より求められる PM 頻度の約 46% となった。新規の 2 種類の遺伝子変異を見だし、判定法を確立することで PM を 12% 多く判定できるようになった。

(3) CYP2D6 遺伝子変異の表現型への影響

CYP2D6 で代謝される抗ヒスタミン薬で PM と推定された被験者では CYP2D6*10 を有している頻度が高いことに注目し、この遺伝子変異の薬物反応性に及ぼす影響を検討した。CYP2D6*10 および、前章で見いだした 2 種類の遺伝子変異を含めて、デキストロトルファンで *in vivo* 代謝試験した日本人健常者の CYP2D6 遺伝子を解析し、10 種類の変異 (CYP2D6*2、CYP2D6*3、CYP2D6*4、CYP2D6*5、CYP2D6*8、CYP2D6*10、CYP2D6*10C-10C、CYP2D6*14、CYP2D6*18 および CYP2D6*2I) の有無と活性の強さの関連を検討した。98 名の遺伝子を解析した結果、CYP2D6*10 のアリル頻度は約 40% であり、野生型の CYP2D6*1 とほぼ同程度であった。また、PM の原因となる遺伝子変異の頻度は全欠損型である CYP2D6*5 以外は著しく低く、CYP2D6*5 をホモ接合体で有する 1 名の PM を見いだしたのみであった。CYP2D6*10 ホモ接合体では、PM の原因となる遺伝子変異をヘテロ接合体で有する場合より活性が低下した。特に日本人では頻度が高いため、CYP2D6*10 を判定することは重要であると考えられた。従来 CYP2D6*10 は PM の原因遺伝子とは考えられていなかったが、前章で見いだした CYP2D6*10C-10C の存在や、本章での検討結果から、薬物によっては PM の予測率向上のために CYP2D6*10 の考慮が必要となる可能性があると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鎌 滝 哲 也
副 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 助 教 授 大 熊 康 修
副 査 助 教 授 有 吉 範 高

学 位 論 文 題 名

ヒト *CYP2D6* の新規遺伝子多型の発見と 遺伝子診断法の確立

申請者は通常量の薬物を投与したときに、代謝の遅いヒト (poor metabolizer; 以下 PM) で認められる効き過ぎや副作用の危険性を未然に防ぐために、薬物治療前に患者が PM か否かを遺伝子診断で判定可能にすることを目的とし、世界的な研究成果を得た。すなわち、本研究では、チトクローム P450 (以下 CYP) 2D6 の日本人における PM の頻度を算出するために、PM の原因となる遺伝子変異の頻度を検討した。さらに、PM の遺伝子を解析し、PM の原因となる遺伝子変異を 2 種類見いだし、それらを含め遺伝子変異の表現型への影響を検討した。本研究は薬物代謝酵素、ことにその中心的な酵素である CYP の遺伝的多型に関連して、ヒトにおける副作用の回避に有用な概念を提供するものであり、以下に詳述するように極めて優れた研究成果であると評価される。

(1) PM の原因となる *CYP2D6* 遺伝子変異の頻度解析

欧米白人で PM の 90%以上を説明できるとされる *CYP2D6**3、*CYP2D6**4 および *CYP2D6**5 と、当研究室の Yokoi らが日本人 PM より見いだした *CYP2D6**18、さらに *CYP2D6**8 および *CYP2D6**14 の 6 種類の遺伝子変異の日本人での頻度を解析した。*CYP2D6**3 は 282 名の内、この変異を有している被験者を 1 名も見いだすことは出来なかった。*CYP2D6**4 は 270 名中ヘテロ接合体で変異を有する 4 名を見いだした。*CYP2D6**5 は 256 名を判定した結果、19 名がヘテロ接合体で、1 名がホモ接合体で変異を有していた。*CYP2D6**8 と *CYP2D6**14 は 226 名判定したが、この変異を有している被験者は 1 名も見いだせなかった。*CYP2D6**18 は 297 名判定し、この変異をヘテロ接合体で有する 3 名を見いだした。これらの変異の頻度から算出された PM の頻度は 0.29%であり、*in vivo* 代謝試験から求められた PM 頻度である 0.84%の約 34% を占めるのみであった。

(2) PM の原因となる未知の *CYP2D6* 遺伝子変異の探索と診断法の確立

(1) に述べた結果より、上記の 6 種類の遺伝子変異以外に PM の原因となる未知の遺伝子変異が存在すると予想された。そこで、未知の多型を探索する目的で、デブリソキンを用いて *in vivo* 代謝試験を行い、見いだされた 2 名の PM の CYP2D6 遺伝子を解析した。塩基配列を解析した結果、PM の原因と予想される新しい遺伝子変異を 2 種類見いだした。1 つは、直後にストップコドンを生じさせるエクソン 5 での 1 塩基の挿入であり、これは国際 P450 命名委員会により CYP2D6*21 と命名された。もう 1 つの変異は、CYP2D6*10B を有しておらず、CYP2D6*10C をタンデムに有する新しい遺伝子変異 CYP2D6*10C-10C であった。次に、これら 2 種類の遺伝子変異を簡便に判定できる方法を確立した。CYP2D6*21 は健常日本人 318 名中、ヘテロ接合体が 5 名見いだされた。CYP2D6*10C-10C はさらに 2 名の PM で見いだされたが、ランダムに選択した 149 名には見いだすことはできなかつたため、頻度が低いことが予想された。これらの頻度と、(1) で明らかにした 6 種類の変異の頻度より、日本人における PM の頻度は約 0.39% と計算され、この値は *in vivo* 代謝試験より求められる PM 頻度の約 46% となった。

(3) CYP2D6 遺伝子変異の表現型への影響

CYP2D6 で代謝される抗ヒスタミン薬で PM と推定された被験者では CYP2D6*10 を有している頻度が高いことに注目し、この遺伝子変異の薬物反応性に及ぼす影響を検討した。(2) で見いだした 2 種類の遺伝子変異を含めて、デキストロメトルファンで *in vivo* 代謝試験した日本人健常者の CYP2D6 遺伝子を解析し、10 種類の変異の有無と活性の強さの関連を検討した。98 名の遺伝子を解析した結果、CYP2D6*10 のアリル頻度は約 40% であり、野生型 CYP2D6*1 と同程度であった。CYP2D6*10 ホモ接合体では、PM の原因となる遺伝子変異をヘテロ接合体で有する場合より活性が低下した。

以上、本研究は PM の原因となる CYP2D6 遺伝子変異を 2 種類見だし、簡便に判定できる方法を確立した。さらに、日本人で頻度の高い CYP2D6*10 の活性への影響を明らかにした。本研究は分子生物学から薬物代謝学さらには臨床薬理学に至る広範な分野で極めて高く評価される。本論文『ヒト CYP2D6 の新規遺伝子多型の発見と遺伝子診断法の確立』に含まれる研究成果は薬学における基礎および応用のいずれにおいても優れており、博士 (薬学) の学位を受けるに充分値するものと認めた。