

学位論文題名

日本人における新規 *CYP2D6* 遺伝子多型の機能解析と 迅速判定法

学位論文内容の要旨

チトクローム P450 (CYP) 2D6 は、降圧薬、 β -遮断薬および三環系抗うつ薬など臨床で多くの重要な薬物の代謝に関与している。本酵素の活性には大きな個人差があり、その主な原因は *CYP2D6* 遺伝子多型によるものであると考えられている。欧米人では低代謝能群である poor metabolizer (PM) の頻度は 5~10% であり、この PM の 90% 以上が *CYP2D6**3, *4 および *5 で説明することができる。しかしながら、日本人の PM の頻度は 1% 程度と低いにもかかわらず、これまでに報告されている *CYP2D6* 遺伝子多型でも十分に説明することができない。また、日本人には *CYP2D6**10 と呼ばれる PM 程ではないものの extensive metabolizer 群よりも代謝能が低くなる intermediate metabolizer (IM) の原因となり得る遺伝子多型が高頻度存在する。IM の原因となる遺伝子多型をホモ接合体で有するヒトが *CYP2D6* で代謝される薬物を投与すると、 C_{max} が約 6 倍になり、これは臨床現場においても無視することはできない。

そこで本研究では、日本人における個人差の原因となる新規遺伝子多型の探索と *CYP2D6* 酵素活性の低下および欠失の原因となる遺伝子多型を迅速に判定する方法を確立することを目的とした。

1. 日本人における *CYP2D6* 遺伝子多型の網羅的な探索

日本人 424 名において *CYP2D6* 遺伝子の 5'-上流領域、全エクソンおよびエクソン-イントロン接合部位の塩基配列をダイレクトシーケンス法により解析した。その結果、g.82C>T と g.2950G>C を併せ持つ *CYP2D6**44 アリル、*CYP2D6**10 アリルの変異に加え、g.3318G>A (Glu383Lys) を併せ持つ *CYP2D6**10(3318) アリルおよび *CYP2D6**10 アリルの変異と g.1611T>A (Phe120Ile) を併せ持つ *CYP2D6**49 アリルを見出した。*CYP2D6**44, *10(3318) および *49 のアリル頻度はそれぞれ 0.1%, 0.1% および 0.4% であった。

2. *CYP2D6**44 遺伝子多型の機能解析

g.2950G>C はエクソン 6 のスプライスドナーサイトの変異であり、スプライシングに

影響を及ぼすことが予想された。そこで *in silico* 解析によりスプライドナーサイトとして g.2993G が新たな候補となり得ることを見出した。このスプライスバリエントが実際に存在するか否かを検討するため、*in vitro* 解析によりスプライシングパターンを野生型と比較した。CYP2D6*44 では、正常なスプライシング産物は検出されず、g.2993G をスプライドナーサイトとするスプライスバリエント (SV1) およびイントロン 6 でのスプライシングを受けないスプライスバリエント (SV2) を検出した。SV1 および SV2 は、共にフレームシフトにより未熟ストップコドンを生じ、酵素機能を欠失すると考えられた。In vivo 代謝試験として、デキストロメトルファン O-脱メチル化代謝効率 (MR) を算出した結果においても CYP2D6*44 を有する検体の MR 値は、他の CYP2D6 遺伝子多型群と比較して高値を示した。以上のことから、CYP2D6*44 は PM を引き起こす遺伝子多型である可能性が高いと考えられた。

3. CYP2D6*10(3318), *49 の機能解析

変異型 CYP2D6 を発現する大腸菌株を用いてデキストロメトルファン O-脱メチル化反応に対する速度論的解析を行った。その結果、CYP2D6.10(383) および CYP2D6.49 の $V_{\max}/K_m$ 値は、それぞれ野生型 (CYP2D6.1) の 1.3% および 0.5% であった。さらに、興味深いことに CYP2D6*49 をヘテロ接合体で有する日本人肝ミクロゾームサンプルから新規代謝物と考えられるピークを検出した。そこで、LC/MS/MS により新規代謝物の同定を行った結果、7-ヒドロキシデキストロメトルファンであることが示唆された。以上のことから、CYP2D6*10(3318) および CYP2D6*49 は CYP2D6 の酵素活性の個人差、特に CYP2D6*10 アリルを有するヒトの間に認められる個人差の原因となることを明らかにした。

4. CYP2D6 酵素活性の低下・欠失の原因となる遺伝子多型の迅速判定法

本研究における 9 種類の日本人の CYP2D6 酵素活性の低下および欠失の原因となる遺伝子多型をキャピラリー式サーマルサイクラーによりハイブリダイゼーションプローブ法を用いて迅速判定法の開発を行った。全欠損型である CYP2D6*5 の判定法は、CYP2D6 遺伝子と 偽遺伝子 (CYP2D8) のコピー数の比を求めることにより、CYP2D6*5 の有無を判定した。CYP2D6*5 アリル以外に日本人において酵素活性を低下させる遺伝子多型 (CYP2D6*4, *10, *14, *18, *21, *41, *44 および *49) についても同一反応条件下で、一塩基多型あるいは塩基挿入部分を検出することに成功した。この方法により 9 種類の遺伝子多型を 1 時間で同時に検出する系を確立した。

以上、本研究によって日本人における CYP2D6 の酵素活性低下および欠失の原因となる遺伝子多型の予測率を上げることができ、テイラーメイド医療を目指した迅速判定法を開発した。本論文『日本人における新規 CYP2D6 遺伝子多型の機能解析と迅速判定法』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。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鎌 滝 哲 也
副査	教授	原 島 秀 吉
副査	助教授	紙 谷 浩 之
副査	助教授	菅 原 満

学位論文題名

日本人における新規 *CYP2D6* 遺伝子多型の機能解析と 迅速判定法

チトクローム P450 (*CYP*) 2D6 は、降圧薬、 β -遮断薬および三環系抗うつ薬など临床上多くの重要な薬物の代謝に関与している。本酵素の活性には大きな個人差があり、その主な原因は *CYP2D6* 遺伝子多型によるものであると考えられている。欧米人では低代謝能群である poor metabolizer (PM) の頻度は 5~10% であり、この PM の 90% 以上が *CYP2D6**3, *4 および *5 で説明することができる。しかしながら、日本人の PM の頻度は 1% 程度と低いにもかかわらず、これまでに報告されている *CYP2D6* 遺伝子多型でも十分に説明することができない。また、日本人には *CYP2D6**10 と呼ばれる PM 程ではないものの extensive metabolizer 群よりも代謝能が低くなる intermediate metabolizer (IM) の原因となり得る遺伝子多型が高頻度に存在する。IM の原因となる遺伝子多型をホモ接合体で有するヒトが *CYP2D6* で代謝される薬物を投与すると、 $C_{\max}$ が約 6 倍になり、これは臨床現場においても無視することはできない。

そこで本研究では、日本人における個人差の原因となる新規遺伝子多型の探索と *CYP2D6* 酵素活性の PM および IM の原因となる遺伝子多型を迅速に判定する方法を確立することを目的とした。

1. 日本人における *CYP2D6* 遺伝子多型の網羅的な探索

日本人 424 名において *CYP2D6* 遺伝子の 5'-上流領域、全エクソンおよびエクソン-イントロン接合部位の塩基配列をダイレクトシーケンス法により解析した。その結果、g.82C>T と g.2950G>C を併せ持つ *CYP2D6**44 アリル、*CYP2D6**10 アリルの変異に加え、g.3318G>A (Glu383Lys) を併せ持つ *CYP2D6**10(3318) アリルおよび *CYP2D6**10 アリルの変異と g.1611T>A (Phe120Ile) を併せ持つ *CYP2D6**49 アリルを見出した。*CYP2D6**44, *10(3318) および *49 のアリル頻度はそれぞれ 0.1%, 0.1% および 0.4% であった。

2. CYP2D6*44 遺伝子多型の機能解析

g.2950G>C はエクソン 6 のスプライスドナーサイトの変異であり、スプライシングに影響を及ぼすことが予想された。そこで *in silico* 解析によりスプライスドナーサイトとして g.2993G が新たな候補となり得ることを見出した。このスプライスバリエントが実際に存在するか否かを検討するため、*in vitro* 解析によりスプライシングパターンを野生型と比較した。CYP2D6*44 では、正常なスプライシング産物は検出されず、g.2993G をスプライスドナーサイトとするスプライスバリエント (SV1) およびイントロン 6 でのスプライシングを受けないスプライスバリエント (SV2) を検出した。SV1 および SV2 は、共にフレームシフトにより未熟ストップコドンを生じ、酵素機能を欠失すると考えられた。In vivo 代謝試験として、デキストロメトルファン O-脱メチル化代謝効率 (MR) を算出した結果においても CYP2D6*44 を有する検体の MR 値は、他の CYP2D6 遺伝子多型群と比較して高値を示した。以上のことから、CYP2D6*44 は PM を引き起こす遺伝子多型である可能性が高いと考えられた。

3. CYP2D6*10(3318), *49 の機能解析

変異型 CYP2D6 を発現する大腸菌株を用いてデキストロメトルファン O-脱メチル化反応に対する速度論的解析を行った。その結果、CYP2D6.10(383) および CYP2D6.49 の $V_{\max}/K_m$ 値は、それぞれ野生型 (CYP2D6.1) の 1.3% および 0.5% であった。さらに、興味深いことに CYP2D6*49 をヘテロ接合体で有する日本人肝ミクロゾームサンプルから新規代謝物と考えられるピークを検出した。そこで、LC/MS/MS により新規代謝物の同定を行った結果、7-ヒドロキシデキストロメトルファンであることが示唆された。以上のことから、CYP2D6*10(3318) および CYP2D6*49 は CYP2D6 の酵素活性の個人差、特に CYP2D6*10 アリルを有するヒトの間に認められる個人差の原因となることを明らかにした。

4. CYP2D6 酵素活性の低下・欠失の原因となる遺伝子多型の迅速判定法

本研究における 9 種類の日本人の CYP2D6 酵素活性の低下および欠失の原因となる遺伝子多型をキャピラリー式サーマルサイクラーによりハイブリダイゼーションプローブ法を用いて迅速判定法の開発を行った。全欠損型である CYP2D6*5 の判定法は、CYP2D6 遺伝子と偽遺伝子 (CYP2D8) のコピー数の比を求めることにより、CYP2D6*5 の有無を判定した。CYP2D6*5 アリル以外に日本人において酵素活性を低下させる遺伝子多型 (CYP2D6*4, *10, *14, *18, *21, *41, *44 および *49) についても同一反応条件下で、一塩基多型あるいは塩基挿入部分を検出することに成功した。この方法により 9 種類の遺伝子多型を 1 時間で同時に検出する系を確立した。

以上、本研究によって日本人における CYP2D6 の酵素活性低下および欠失の原因となる遺伝子多型の予測率を上げることができ、テイラーメイド医療を目指した迅速判定法を開発した。本論文『日本人における新規 CYP2D6 遺伝子多型の機能解析と迅速判定法』

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。