

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	小川研人
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>薬理遺伝学の法医学分野における個人識別への応用－ チトクロム P450 分子種の変異遺伝子の出現頻度とその組み合わせの有用性</p> <p>共著者名</p> <p style="text-align: center;">須野 学、清水恵子、吉田将亜、栗屋敏雄、 松原和夫、塩野 寛</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>現在、法医学分野での身元不明遺体の個人識別の手段として、カルテやエックス線写真に基づく歯科所見や手術痕、指紋、血液型、DNA 多型検査等が用いられるが、それら殆どは、生前の記録を必要とし、入手可能とは限らない。特に、DNA 多型検査は陳旧性や微量の試料にも利用可能なため広く行われるが、生前、その検査が行われることは稀である。</p> <p>一方、薬理遺伝学の進歩により、本邦を含む先進諸国においては、個人最適化医療（テーラーメイド医療とも言う）が実施できるよう準備が進められている。個人最適化医療とは、個々人に合った最適な薬物療法を行おうとするものである。この理由は、主に薬物代謝酵素をコードする遺伝子の変異により、個々人への薬物の効果が大きく異なることによる。しかし、この個人最適化医療には、個々人の薬物代謝酵素の遺伝子型を判定することが前提となる。従って、近い将来には、ABO 血液型と同様に、代謝酵素遺伝子型は個々人が生前に検査を受ける項目になるであろう。</p> <p>薬物の多くは、数多い薬物代謝酵素の中でも、チトクロム P450（CYP）系で代謝を受ける。近年 CYP には、種々の分子種とそれらの遺伝子多型が存在することが解明されている。本研究では、個人最適化医療具現化の上で重要となる 5 種の CYP（CYP1A2、CYP2D6、CYP2E1、CYP2C9、CYP2C19）のアリル及び遺伝子型頻度とその組み合わせ頻度を求め、これらの情報が個人識別への有用な手段となり得るかを考察した。</p>			

材料・方法

1. 実験試料

北海道における健常な日本人 196 名から採取した末梢血を用い、フェノールクロロホルム法によりゲノム DNA を抽出した。5 種類の *CYP* の分子種について変異型を、polymerase chain reaction (PCR) 法に基づいて allele・遺伝子型頻度とその組み合わせ頻度を求めた。

2. 実験方法

2-1. *CYP1A2* 多型 : PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法を用いた。即ち、5'-flanking region の -3858G→A の single nucleotide polymorphism (SNP) を含む一定領域を PCR 法により増幅し 596 bp の増幅産物を確認後、制限酵素 *Dde* I を加え 37℃で一晩インキュベートした。-3858 番目の配列に G→A 変異を持つ PCR 増幅産物は、464 と 132 bp の断片を生じる。

2-2. *CYP2D6* 多型 : Allele specific PCR 法によりそれぞれの SNP に特異的なプライマーを用い、増幅産物 2D6*1、2D6*2、2D6*10 を判定した。最初に *2 の検出と、それとは別のチューブでの *1 及び *10 を含む部位の増幅を行った。後者の増幅産物は再度 188C または 188T を特異的に増幅可能なプライマーを用いて PCR が行われ 188C のものを *1、188T のものを *10 とした。*5 もこれを特異的に検出可能な配列を持つプライマーを用いて増幅が確認されれば *5 のアレルであるとした。

2-3. *CYP2E1* 多型 : *5 に含まれる 5'-flanking region の SNP を判定した。PCR 反応による 413 bp の増幅産物を確認後、制限酵素 *Pst* I を添加し一晩インキュベーションした。-1293G→C 変異を持つ *5 は 118 と 295 bp の断片を生じる。

2-4. *CYP2C9* 多型 : *2 の Exon 3 の 430 番目の塩基置換 C→T、*3 の Exon 7 の 1975 番目の塩基置換 A→C の変異をそれぞれ制限酵素 *Ava* II、*Nsi* I の切断による PCR-RFLP 法により確認した。

2-5. *CYP2C19* 多型 : *2 の Exon 5 の 681 番塩基置換の G→A 及び *3 の Exon 4 の 636 番塩基置換の G→A を判定した。*2 では PCR 反応により 169 bp の増幅産物確認後、制限酵素 *Sma* I の切断の有無により、120 bp と 49 bp の断片を生じるものを *1、生じないものを *2 とした。*3 の PCR 条件はプライマー以外は同じ条件で行い、増幅産物の 329 bp を確認後、制限酵素 *Bam*HI で切断され 233 bp と 96 bp の断片を生じるものを *1、切断されないものを *3 とした。

成績

検査対象とした中で、日本人での検出の報告のない、*CYP2C9**2 はこの実験において

も検出されなかった。5つの *CYP* それぞれのアリル頻度から Hardy-Weinberg の法則により予想される遺伝子型の頻度を求め、実測値と χ^2 検定を行ったところ、得られた値はいずれも母集団を反映することが示された。この中で、個人識別に最も有用なのは *CYP2D6* (power of discrimination=0.783) であり、逆に、最も有用とならないのは、*CYP2C9* であった (power of discrimination=0.097)。他の3つの分子種の power of discrimination 値は、全て 0.6 以上であり、法医学的に有用であった。

また、今回検査対象とした5つの *CYP* 分子種の遺伝子型の組み合わせは、*CYP2C9**2をも含めると、3240通り可能である。しかし、実際に得られた組み合わせは101通りであった。これらの中で、196人中7人、すなわち頻度 0.036 と最も高い出現頻度を示した組み合わせは、*CYP1A2**1A/*1A・*CYP2D6**1/*10・*CYP2E1**1/*1・*CYP2C9**1/*1・*CYP2C19**1/*1 と *CYP1A**1A/*1C・*CYP2D6**1/*10・*CYP2E1**1/*1・*CYP2C9**1/*1・*CYP2C19**1/*1 の2通りであった。それ以外の組み合わせの出現頻度は、今回対象とした196例の中ではいずれも 0.031 以下となった。

考察

医薬品の使用に対する個体差はよく知られており、常用量の使用でも重篤な有害事象をもたらすことがある。この原因の多くは肝臓における薬物代謝酵素 *CYP* 分子種の変異によることが知られ、その遺伝子の、個々人の薬物代謝酵素遺伝子を予め判定し、最適な薬物療法を行おうとする、個人最適化医療が推奨されている。従って、近い将来、ABO 血液型と同様に、個々人が生前に検査を受ける項目になると考えられる。このことは、法医学上、個人識別に極めて重要な情報をもたらすことになる。また、人類遺伝学的にも民族間によるアリル発生頻度の違いが系統学的分類に有用である。日本人集団における個々の *CYP* 分子種のアリル・遺伝子型頻度はすでに報告されているが、その組み合わせについては報告がない。*CYP* 分子種の多型は、極めて多数存在するが、多型が多く認められているのは *CYP2C* ファミリーであり、中でも薬物代謝に影響を大きく及ぼすのは *CYP2D6*、*CYP2E1*、*CYP2C9*、*CYP2C19* である。薬物代謝を考える上で、*CYP* スーパーファミリーの中で重要なものとして *CYP1A2* もあげられるため今回、調査した。

本研究では頻度調査が行われたが、法医学分野の剖検においては、中毒死が疑われる事例でも、これらの *CYP* 分子種の変異の判定を行うことは、死因究明の一助となり得る。しかし、本研究で用いた PCR-RFLP 法と増幅産物の有無のみで変異を確認する allele specific PCR 法は煩雑であり、DNA チップ等の簡便な判定方法が臨床応用可能となれば、有用性は増す。また、今後代謝酵素以外にも、遺伝子多型が薬物効果に影響を及ぼす、レセプター・トランスポーター・イオンチャンネル等も調査されれば、個人識別に利用できるようになりうる。





結論

個人最適化医療を実施する上で、重要な *CYP* 5つの組み合わせは 3240 通り可能であるが、得られた組み合わせは 101 通りであった。最も高い組み合わせの遺伝子頻度でもその値は 0.036 であり、将来個人最適化医療が広く行われるようになり、生前の DNA 型検査が日常的になれば、法医学上の個人識別に極めて有用であることが判明した。

引用文献

- Tateishi, T., Chida, M., Ariyoshi, N., Mizorogi, Y., Kamataki, T., and Kobayashi, S. Analysis of the *CYP2D6* gene in relation to dextromethorphan *O*-demethylation capacity in a Japanese population. *Clin. Pharmacol. Ther.* **65**, 570-573 (1999).
- Suno, M., Awaya, T., Ogawa, K., Ohtaki, K., Chiba, K., Hayase, N., and Matsubara, K.. A wax-Mediated hot-start polymerase chain reaction improves the genotyping of *CYP2C9**1 and *3 alleles. *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **33**, 215-218 (2002).
- Nakajima, M., Yokoi, T., Mizutani, M., Kinoshita, M., Funayama, M., and Kamataki, T. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human *CYP1A2* gene : effect on the *CYP1A2* inducibility in humans. *J. Bioch.* **125**, 803-808 (1999).

学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	小 川 研 人
審査委員長 高後 裕  審査委員 塩野 寛  審査委員 松原 祐夫  審査委員 半谷 文隆 			
学 位 論 文 題 目 薬理遺伝学の法医学分野における個人識別への応用 一チトクロム P450 分子種の変異遺伝子の出現頻度とその組み合わせの有用性			
<p>法医学での身元不明遺体の個人識別の手段には、血液型や指紋と共に DNA 多型検査を用いる。DNA 多型検査は、陳旧性や微量の試料にも利用可能な為、広く行われるが、一般的にその検査を生前には行わない。一方、日本では、臨床での薬物療法において、薬物代謝能に影響を及ぼす遺伝子型の個人差に基づく、個人最適化医療（テーラーメイド医療）を実施しようとしている。これは、薬物代謝酵素をコードする遺伝子の変異が薬物代謝能に影響を及ぼすことから、薬物代謝酵素多型を検査し、個々人に最適な薬物療法を提供しようとするものである。</p> <p>本研究は、個人最適化医療において重要な位置を占めるチトクロム P450 (CYP) の 5 種類の分子種 (CYP1A2、CYP2D6、CYP2E1、CYP2C9、CYP2C19) のアリル頻度、遺伝子型頻度とそれらの組み合わせ頻度を求め、個人識別に有用であるか検討したものである。</p>			

そこで、論文提出者は、本研究において 5 種類の *CYP* 分子種のそれぞれの変異型アリルを *CYP2D6* では allele specific PCR 法により、その他の *CYP* 分子種では PCR-RFLP 法により検出した。5 種類の *CYP* の遺伝子型の組み合わせは、今回調査対象とした変異型アリルでは、理論的には 3240 通り可能であるが、被験者 196 名の日本人で実際に検出した組み合わせは 101 通りであった。その中で、最も出現頻度が高い組み合わせは 2 種類存在し、それは *CYP1A2**1A/*1A・*CYP2D6**1/*10・*CYP2E1**1/*1・*CYP2C9**1/*1・*CYP2C19**1/*1 と *CYP1A2**1A/*1C・*CYP2D6**1/*10・*CYP2E1**1/*1・*CYP2C9**1/*1・*CYP2C19**1/*1 で、頻度は 196 名中 7 名の 0.036 であった。また他の組み合わせ頻度はいずれも、0.031 以下となり、出現頻度が 0.005 と最低の 1 名のみ検出した組み合わせは、55 通りであった。

個々の *CYP* 分子種については、個人識別への有用性を power of discrimination (PD) と heterozygosity (HET) により評価したところ、PD と HET はそれぞれ、*CYP2D6* が 0.783 と 0.623、*CYP2C19* は 0.723 と 0.543、*CYP1A2* は 0.723 と 0.383、*CYP2E1* は 0.616 と 0.336、*CYP2C9* は 0.097、0.051 であり、今回調査対象とした中では、*CYP2D6* と *CYP2C19* の個人識別への有用性が高いと考えられた。*CYP2C9* は、アリル出現頻度が 0.026 と極端に少なかった*3 あるいは、東洋人では未確認で、今回も未検出の*2 が検出されない限りは、個人識別への有用性は低いと考えられた。

以上の結果より、*CYP* 分子種の遺伝子型頻度とその組み合わせ頻度は、今後、日本において、個人最適化医療が普及すれば、個人識別の DNA 多型検査の一助となり得ることが示唆された。従って、本論文は法医学的に重要な情報を提供するものである。

なお、各審査委員による本論文の内容および関連領域についての試問には適切な応答が得られた。以上より、審査委員会は、本論文が学位論文に値するものと判定した。