

グルクロン酸転移酵素多型による薬物副作用の予知法開発に関する研究

●佐藤浩¹⁾ ◆丸尾良浩²⁾

1) 滋賀医科大学医学部生命科学講座 2) 滋賀医科大学医学部小児科学講座

＜研究の目的と進め方＞

研究の目的

日本人のグルクロン酸転移酵素遺伝子の変異の種類と頻度を明らかにし、それらの変異が個々の薬物活性にどのような影響をあたえるか検討する。

研究の進め方

日本人に多く見られるグルクロン酸転移酵素遺伝子の頻度を調べると同時にグルクロン酸抱合をうける薬剤で副作用を示す患者の遺伝子解析を行う。同時にグルクロン酸転移酵素遺伝子 UGT1 グループの主要な遺伝子をクローニングし、それらの発現ベクターを作製し、日本人に見いだされた遺伝子変異による酵素活性低下を評価できる培養細胞を用いた系を確立する。

＜研究開始時の研究計画＞

初年度（平成12年）計画

日本人に多く見られるグルクロン酸転移酵素の変異を UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4 で検討する。遺伝子変異（多型）による活性低下の評価をおこなうため、発現ベクターを作製し、それらを導入して酵素活性を発現する培養細胞系を確立する。平行して、グルクロン酸抱合をうける薬剤で副作用を示す患者の遺伝子解析をおこなう。

第2年度（平成13年）計画

正常および変異のある各種のグルクロン酸抱合酵素を発現している培養細胞を用いて薬剤の副作用を *in vitro* で予測できるようにする。初年度に続いてグルクロン酸抱合酵素をうける薬剤で副作用を示す患者の遺伝子解析をおこなう。さらに変異検出システム（Bio-Rad, DGGE:変性剤濃度勾配電気泳動法）を用いて簡便迅速に既知の遺伝子を検出できる方法を確立する。初年度に確立した系を持ちいてグルクロン酸転移酵素の変異を UGT1A1, 1A3, 1A4 で検討し、変異による活性低下の評価をおこなう。

＜研究期間の成果＞

グルクロン酸転移酵素遺伝子 UGT1A3と UGT1A4 に多型とその頻度を調べた。また、日本人に見いだされたそれらの遺伝子多型による酵素活性低下の評価を行った（論文3と5）。ともに100名の健常者より同意をえて遺伝子多型の検索をおこなった。UGT1A3では6つの新たなSNIPsを見だし、その中にQ6R、W11R、R45W、V47Aの4つのアミノ酸置換をもたらす変異が存在した。対立遺伝子は野生型（0.61）、W11R（0.10）、Q6A-W11R（0.055）、W11R-V47A（0.125）、R45W（0.11）の5つの型が存在した。W11R-V47AをもつUGT1A3酵素はエストロンを基質として用いた場合、正常の3.7倍の酵素効率（ K_m/V_{max} ）を示した。W11R、Q6A-W11R、R45Wの酵素効率はそれぞれ121、86、70%であった。

UGT1A4では4カ所のSNIPsを見いだした。アミノ酸の置換を生ずる対立遺伝子として遺伝子頻度が0.16のL48Vが1つ存在した。抗精神病薬クロザピンを基質とした変異をもつ酵素の K_m/V_{max} は野生型の2倍の値であった。アンドロステロン、イミピラミン、シプロヘプタジン、

チゴゲニンに対する K_m/V_{max} はそれぞれ野生型の104、180、160、60%であった。

＜国内外での成果の位置づけ＞

グルクロン酸転移酵素遺伝子 UGT1A3については多型の存在と、活性の変化について世界で初めて報告した。本酵素はエストロゲンの代謝に関与しており、今後子宮ガン、乳ガン、骨粗鬆症などを見いだされた多型の関連について、それらの領域の研究者との共同研究をおこなう必要がある。

グルクロン酸転移酵素遺伝子 UGT1A4についてはわれわれの論文が発表される直前にドイツのStrassburgらがドイツ人で行った研究を発表した。ドイツ人、日本人とも多型としてL48VのみがUGT1A3に存在する。しかし、彼らの報告ではL48V酵素の詳細な酵素学的研究が行われていない。本研究によってL48V多型患者への薬剤投与に関する基礎データがえられた。

これらの研究は2004年にスコットランドのDundeeで開催されたグルクロン酸抱合ワークショップで報告した。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

日本人のグルクロン酸転移酵素遺伝子の変異の種類と頻度についてはUGT1A1、1A3、1A4を明らかにしたが、それ以外の遺伝子については現在検討を継続している。その他の遺伝子の解析ができなかった理由の1つは国内外から急を要する遺伝子解析（生体肝移植での確定診断のため見いだされた変異の遺伝子発現を行う必要があったことなど）のため十分な研究時間が確保できなかった。

変異検出システムにより、簡便迅速に既知の遺伝子を検出できる方法を確立することに関してはBio-RadのDGGE:変性剤濃度勾配電気泳動法を用いて試みたが、微妙な差を検出するため、判定が難しい変異もあり完成させることができなかった。代わりに臨床検査を行っている会社と共同で、特許を取得し（成果リスト参照:特許出願）、簡便なアッセイキットを開発中である。

グルクロン酸抱合をうける薬剤で副作用を示す患者の遺伝子解析はサンプルを取得することが難しく本研究では行うことができなかった。理由として、このような患者は比較的少ないため、学内で得られる試料にたよっては、解析するためのサンプルが手に入らなかった。その代わりに日本人の遺伝子頻度が0.005であるY486D変異をUGT1A6に導入し、薬剤代謝の変化を検討した。Y486Dは前立腺がんの抗がん剤であるフルタミドの主代謝産物を基質とした場合に、この変異が酵素活性を消失させることを明らかにした。

＜今後の課題＞

1) UGT1から発現する他のアイソフォーム（UGT1A6、UGT1A7、UGT1A8、UGT1A9、UGT1A10）の遺伝子多型とその頻度をしらべ、それぞれの多型について主要な基質となる薬剤の酵素学的研究を行う。目的は日本人の薬剤副作用を予防するための基礎データを作製するため

である。

2) これまで得られた結果を基礎にして臨床講座との共同研究で、適切な薬剤投与やがん感受性と遺伝子多型の関係について検討をおこなう。

3) グルクロン酸抱合酵素をうける薬剤で副作用を示す患者の遺伝子解析を行う。これまでの研究から、学内だけでは患者の試料が十分得られないことが判明したので、学外の臨床医とどのような共同研究を組んだらよいか検討し、出来るだけ早く研究を再開する。

4) 現在、臨床検査会社と共同でグルクロン酸転移酵素遺伝子多型を簡便に調べるキットの開発が進んでいる。キットはほぼ完成しているので、出来るだけ早く臨床で使用できるようにする。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

論文

- 1) 0602071516: Ito,M., Yamamoto,K., Maruo,Y., Sato,H., Fujiyama,Y., Bamba,T. Effect of a conserved mutation in uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 and 1A6 glucuronidation of a metabolite of flutamide. Eur. J. Clin. Pharmacol. 58, 11-14 (2002).
- 2) 0602071036: Maruo,Y., Poon,K.K., Ito,M., Iwai,M., Takahashi,H., Mori,A., Sato,H.,and Takeuchi,Y. Co-occurrence of three different mutations in the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene in a Chinese family with Crigler-Najjar syndrome type I and Gilbert's syndrome. Clin Genet 64:420-233 (2003).
- 3) 0602070903: Iwai,M., Maruo,Y., Ito,M., Yamamoto,K., Sato,H., Takeuchi,Y. Six novel UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A3) polymorphisms with varying activity. J Hum Genet.49, 123-8 (2004).
- 4) 0602071104: Maruo,Y., Topaloglu,A.K., Takahashi,H., Mori,A., Iwai,M., Duzovali,O., Yamamoto,K., Matsui,K., Sato,H., Takeuchi,Y. Crigler-Najjar syndrome type II caused by a homozygous triple mutation [T-3279G, A(TA)'TAA, and H39D]of UGT1A1. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.115, 525-526 (2004).
- 5) 0602091848: Maruo,Y., D'Addario,C., Mori,A., Iwai,M., Takahashi,H., Sato,H., and Takeuchi,Y. Two linked polymorphic mutations (A(TA)7TAA and T-3279G) of UGT1A1 as the principal cause of Gilbert syndrome. Human Genet. 115, 525-526 (2004).
- 6) 0602070943: Mori,A., Maruo,Y., Iwai,M., Sato,H., Takeuchi,Y. UDP-glucuronosyltransferase 1A4 polymorphisms in a Japanese population and kinetics of clozapine glucuronidation. Drug Metab. Dispos.33, 672-675 (2005).
- 7) 0602071120: Maruo,Y., Iwai,M., Mori,A., Sato,H., and Takeuchi Y. Polymorphism of UDP-glucuronosyl-transferase and drug metabolism. Current Drug Metabol 6, 91-99 (2005).

特許出願

- 1) 0602071828丸尾良浩、佐藤浩、高山正法. UGT1核酸配列の変異査方法. 特許出願番号2004-217376 (国際特許分類：G01N 1/00)