



Title	真に医療現場で活用できるゲノム薬理学研究とは？
Author(s)	辻, 亮介
Citation	平成28年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2017
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/60349">https://hdl.handle.net/11094/60349</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 平成28年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏名	つじ りょうすけ 辻 亮介	学部 学科	薬 薬	学年	3年		
ふりがな 共 同 研究者名	はまだ まさや 濱田 将矢	学部 学科	薬 薬	学年	3年		
	ふなだ けいすけ 船田 圭亮		薬 薬		3年		
	こんどう けんたろう 近藤 研太朗		薬 薬		3年		
	くりはら ゆみこ 栗原 由美子		薬 薬		3年		
	アドバイザー教員 氏名		前田真一郎		所属	薬学研究科	
	研究課題名		真に医療現場で活用できるゲノム薬理学研究とは？				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。						

### 1. 背景と目的

薬物はその多くが肝臓に存在する代謝酵素である多種のシトクロム P450 (CYP) により代謝され、それぞれの CYP 分子種については、多くの人でこれをコードする遺伝子で変異を来し（遺伝子多型）、その変異に応じて CYP の代謝能に影響を与えることが知られている。患者の遺伝子的性質と医薬品の作用の関連を調べるゲノム薬理学においては、CYP の遺伝子型とその表現型（代謝能）の関与を探索していくことが 1 つの命題といえる。今回、私たちはモデルとして、カフェインを代謝する酵素として知られる CYP1A2 を選択した。この CYP1A2 を選択したのは、その基質であるカフェインは副作用も少なく取り扱いが容易な上、日常で摂取することも多く単純に興味深く感じたからである。この CYP1A2 はカフェインのほか、イミプラミン、クロザピン、テオフィリン、ワルファリンなど多くの薬物の代謝を行うことが知られており、CYP ファミリーの中でも重要な酵素の 1 つである。この CYP1A2 については野生型 (*CYP1A2\*1A*) に比べ *\*1C* 変異 (-3860G>A) で代謝能が低下することが知られており<sup>(1)</sup>、特に M.Nakajima らによる研究では、尿中のカフェインとカフェイン代謝物の LC-MS/MS 解析と PCR-RFLP 解析の結果、喫煙者に関して *\*1C* 変異を有する人では有意にカフェイン代謝能が低下することが示されている（ただし非喫煙者については有意差なし）<sup>(2)</sup>。また M.Nakajima らの論文のほか多くの論文で、尿中や血液中のカフェイン (137X) とカフェイン代謝物 (paraxanthine;17X) を逆相 LC-MS/MS により定量し、この比 (17X/137X) により CYP1A2 の表現型の決定がなされているが、E.Begas らの論文ではより採取が簡便な唾液について、尿と同様に 17X/137X 比より CYP1A2 の表現型の決定ができることが示されている<sup>(3)</sup>。そこで今回の自主研究では被験者としてボランティアを募り、E.Begas らの唾液を用いた手法を用いて、カフェインとその代謝物の 17X とを検出して CYP1A2 の表現型（代謝能）が決定できることを確かめるとともに、リアルタイム PCR により *CYP1A2* の遺伝子型を決定し、これが CYP1A2 の表現型すなわち 17X/137X 比と相関があるかどうか、すなわち遺伝子型に応じて 17X/137X 比の大小が変化するかを調べていくこととした。

## 2. 方法

### 1) LC-MS/MS 条件検討

まず Waters 社の Acquity UPLC およびタンデム四重極型質量分析装置 TQD を用いた LC-MS/MS について、カフェイン、17X、内部標準物質（4-アセトアミドフェノール）の測定条件の検討を行った。様々な条件でこれら 3 物質の 1 µg/mL 水溶液の LC-MS/MS 測定を行った結果、移動相として 2 mM 酢酸アンモニウム + 0.1% ギ酸水溶液 : 2 mM 酢酸アンモニウム + 0.1% ギ酸メタノール溶液（比率は最初 9:1 で流し、6 分間かけて徐々に比率を 2:3 にし、その後 1 分間その比率を維持した後、再び 9:1 にもどした）を用い、流速 0.20 mL/min、注入量 20 µL で、表 1 の MS 条件で LC-MS/MS を行ったところ、各ピークが検出され、また溶出時間も カフェイン : 5.75 min 付近、17X : 4.8 min 付近、内部標準物質 : 4.05 min 付近 と各ピークが十分に分離できていた。よって、この条件で今後の LC-MS/MS による定量を行った。

### 2) サンプル前処理

E.Begas らの論文の手法に基づいてサンプル前処理を行い、カフェイン代謝能の定量を行った。実際の手法としては、24 時間の断カフェインの後エスエス製薬のエスタロンモカ錠 1 錠（カフェイン 100 mg 含有）を摂取し、その後 6 時間後にフナコシ社の唾液採取キットサリベット（コットン）を用いて採取した唾液サンプルを遠心分離（4000 rpm, 4 min）し、上清 200 µL を取って別のチューブに移し、250 mg の硫酸アンモニウムで飽和させタンパクを析出させ、10 µg/mL 内部標準物質液を 100 µL を加え（カラムに入る際のサンプルの内部標準物質濃度が 5.0 µg/mL になるようにする）、その後代謝物を酢酸エチルの抽出用液で液・液抽出（酢酸エチル 1 mL を加え、ボルテックスの後 4000 rpm, 4 min 遠心分離）、上層（酢酸エチル層）を 500 µL とり、取った酢酸エチルを 45°C で窒素ガスを 3 psi, 4 min で流し、有機層を蒸発させ残留物を 100 µL 水で溶かし、5000 rpm, 2 min で遠心分離した後 LC-MS/MS に注入した。結果、図 1 のようなクロマトグラフが得られたので、この処理が唾液サンプルによるカフェイン・17X の定量・17X/137X 比の導出の上で有効であるとして、以後この手法により被験者に対してカフェイン・17X の定量のサンプル前処理を行った。なお、採取で得られた唾液が少なかったものに対しては 5 倍希釈したもの 200 µL 取りその後同様の操作を行い、得られたカフェイン、17X のピーク面積を 5 倍し解析を行った（予備実験により 5 倍希釈によりピーク面積がほぼ 5 分の 1 になることを確認済み）。

表 1. 本実験での MS 条件			
	Mode	コーン電圧	コリジョンエナジー
カフェイン	ESP+	40V	20eV
17X (パラキサ ンチン)	ESP+	50V	20eV
内部標準物質 (p-アセトアミドフ ェノール)	ESP+	40V	20eV

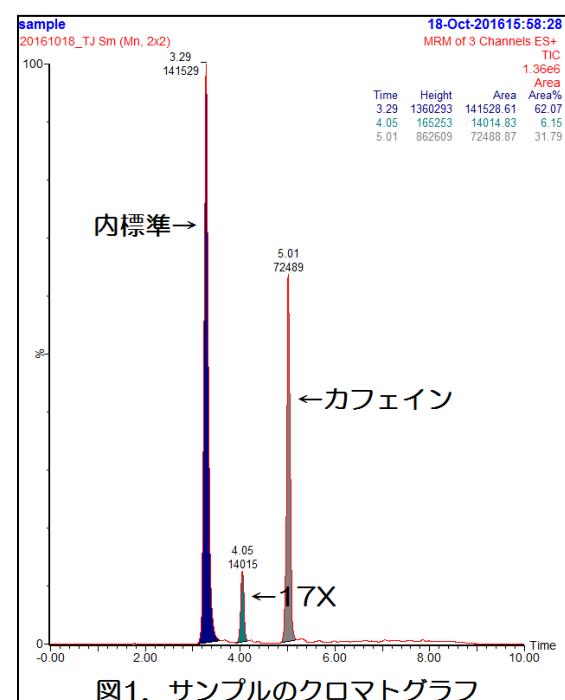


図 1. サンプルのクロマトグラフ

### 3) 検量線作成

前項の手法において、カフェイン錠を摂取していないカフェインフリーのサンプルにカフェイン、17Xを適宜添加し、それらの濃度が 16 µg/mL から 0.1 µg/mL の計 8 濃度になるようにし、これらについて以後前項に記述した操作を行い、検量線用のサンプルを作成した。このサンプルを LC-MS/MS にかけ、得られたカフェイン・17X のピーク面積を内部標準物質のピーク面積で除したものをパラメータとしてプロットし、これを検量線作成ソフトにより最適な重み付けおよび回帰式を選択し、図 2, 3 のような検量線を得た（いずれの検量線も真度・精度は相対誤差が 15%以下の点が 7 点あり、ガイドラインの基準を満たしている）。よってこれ以降の実サンプルのカフェイン・17X の定量については、測定で得たピーク面積比とこの回帰式に基づいて行った。

### 4) CYP1A2 の遺伝子型の決定

被験者の遺伝子型の決定法としては、TaqMan® Drug Metabolism Assays を用いて行った。手法としては、QIAamp DNA Blood Mini Kit を用いて、本キット添付のプロトコールに従い口腔スワブより DNA を抽出し、これを TaqMan® Drug Metabolism Assays の *CYP1A2\*1C* 遺伝子型判定用プライマー (SNP ID : rs2069514) を用いて、添付のプロトコールに従い処理を行い、リアルタイム PCR により DNA 増幅・解析を行い、*CYP1A2\*1C* 変異の有無を調べ、遺伝子型の決定を行った。

### 3. 結果と考察

友人など計 25 名（いずれも健常人、非喫煙者）を被験ボランティアとして募り、唾液による CYP1A2 代謝能決定と *CYP1A2* 遺伝子型決定を行った。（まだ測定できていないサンプルもあるため観測数は 16 名となっている。）その結果は以下の図 4、表 2、3 のようになり、これらについてスチューデントの両側 t 検定を行った。本実験の結果では、文献から予想される結果とは異なり、表 2 のように 17X/137X 比の平均値は野生型(\*1A/\*1A)よりもヘテロ型(\*1A/\*1C)

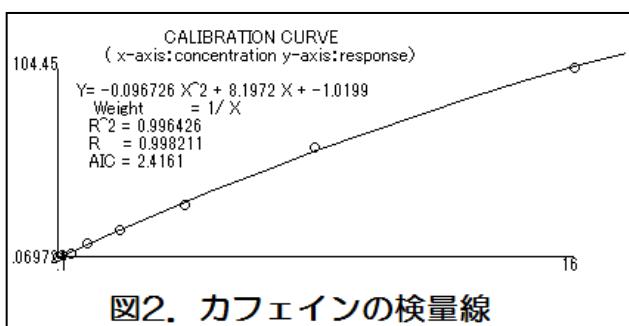


図2. カフェインの検量線

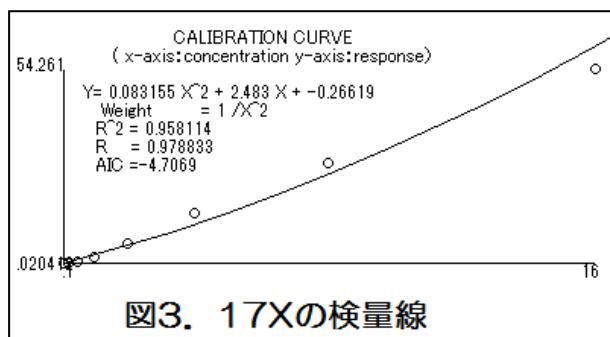


図3. 17Xの検量線

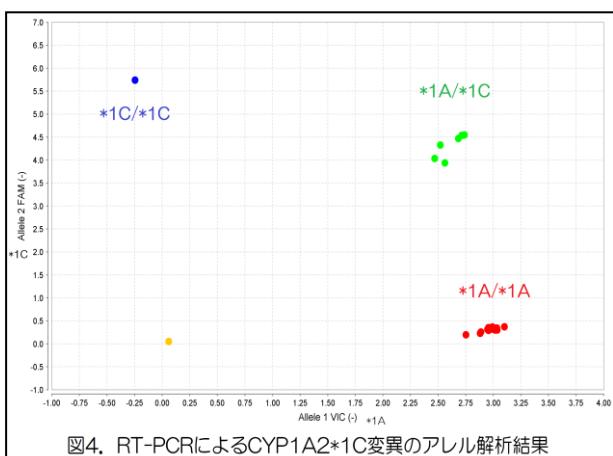


図4. RT-PCRによる*CYP1A2\*1C*変異のアレル解析結果

表2. 17X/137X 統計データ

遺伝型	観測数	平均	分散	標準偏差
*1A/*1A	13	0.269847	0.020241	0.142272
*1A/*1C	2	0.305909	0.005704	0.075522
*1C/*1C	1	0.292472	-	-

表3. 17X/137X 性別ごとの統計データ

性別	観測数	平均	分散	標準偏差
male	9	0.312809	0.021705	0.147325
female	7	0.228146	0.007647	0.087447

の方が低い結果となった( $t=0.327, p=0.749$  : 有意差なし)。一方、性別ごとの 17X/137X 比の平均値の差を見ていくと、表 3 のような差が見られた ( $t=1.24, p=0.23$  : 有意差なし)。

今回 CYP1A2 の表現型と遺伝子型について相関は見られなかったが、その原因としては遺伝子型以外の要素が表現型に大きく関わったためであると考えられる。CYP1A2 は喫煙による誘導が知られており喫煙者と非喫煙者の間の 17X/137X の値が異なることはよく知られている。中でも E.Urry は遺伝子型のほかに BMI や日常でのカフェイン摂取量など、さまざまな基準で群分けをして両群の 17X/137X 比を比較し、差が生じていることを示している（参考表）(4)。

参考表. E.Urry らの研究の 17X/137X の測定結果と独立サンプルの t 検定の結果

特にこの文献からは、日常的なカフェイン摂取やインスリン投与が、17X/137X 比に有意な差を与えることがうかがえる。今回の自主研究における実験でも、遺伝子型よりも性別の方が 17X/137X 比の平均値の差がより大きかったことも

	Group	N	Time-corrected paraxanthine/caffeine ratio	p value
Age	≤59.3 years	77	0.604 (±0.364)	0.290
	>59.3 years	126	0.561 (±0.438)	
BMI	≤24.9 kg/m <sup>2</sup>	117	0.560 (±0.415)	0.580
	>24.9 kg/m <sup>2</sup>	84	0.603 (±0.408)	
Caffeine Intake	≤288 mg/day	139	0.535 (±0.431)	0.010
	>288 mg/day	64	0.669 (±0.350)	
Contraceptive Pill	No	194	0.579 (±0.417)	0.979
	Yes	9	0.545 (±0.282)	
CYP1A2 Inducibility	Less (C/A and C/C genotypes)	103	0.552 (±0.430)	0.284
	High (A/A genotype)	97	0.609 (±0.394)	
Gender	Male	87	0.631 (±0.467)	0.237
	Female	116	0.537 (±0.360)	
Insulin Administration	No	184	0.557 (±0.414)	0.016
	Yes	19	0.770 (±0.336)	
Medication	No	74	0.510 (±0.311)	0.187
	Yes	129	0.616 (±0.456)	
Smoking Status	Non Smoking	182	0.573 (±0.410)	0.896
	Smoking	21	0.617 (±0.430)	

あり、この自主研究を通じて CYP の代謝能が必ずしも遺伝子型に応じて上下せず、他の環境因子の影響が大きいということを実感した。代謝能判定の上では単にゲノム解析するだけでは不十分で、その他さまざまな因子を考慮する必要があるのだろうと考えられる。

個々の患者の代謝能に応じて投薬量を調整したりする、いわゆる個別化医療の進歩が期待される今日においては、各種薬剤について、それを代謝する CYP の研究は必要不可欠である。個別化医療の進歩のためにも、CYP1A2 に限らずさまざまな薬物代謝酵素について、ゲノム薬理学的なアプローチに加え、統計的にその代謝能に影響を与える因子を探索し、個別化医療に向けての検査項目やメソッドの確立が求められるだろうというのが、今回の自主研究を通じて得た見解である。

#### 4. 参考文献

- 1) <https://www.medibic.com/product/okusuri/professional/02-1.html> (2016.10.30)
- 2) M.Nakajima *et al*, Genetic Polymorphism in the 5'-Flanking Region of Human CYP1A2 Gene: Effect on the CYP1A2 Inducibility in Humans. *J. Biochem.* 125, 803-808 (1999)
- 3) E.Begas *et al*, Development and validation of a reversed-phase LC-MS/MS method for CYP1A2 phenotyping by use of a caffeine metabolite ratio in saliva. *Biomed. Chromatogr.* 2015; 29: 1657–1663
- 4) E.Urry *et al*, Assessment of CYP1A2 enzyme activity in relation to type-2 diabetes and habitual caffeine intake. *Nutrition & Metabolism* (2016) 13:66