

H21年度 なって見たかー！ 女性サイエンティストへの レッドカーペット

知りたがる？くすりの効き目と遺伝子の関係
～薬物代謝酵素CYP2C19の遺伝子多型～

2年 上野 希枝 2年 桶田 慧子

2年 大寺 真未 2年 塚本 舞

熊本大学 薬学部 薬物治療学研究室

8月 4日 - 5日

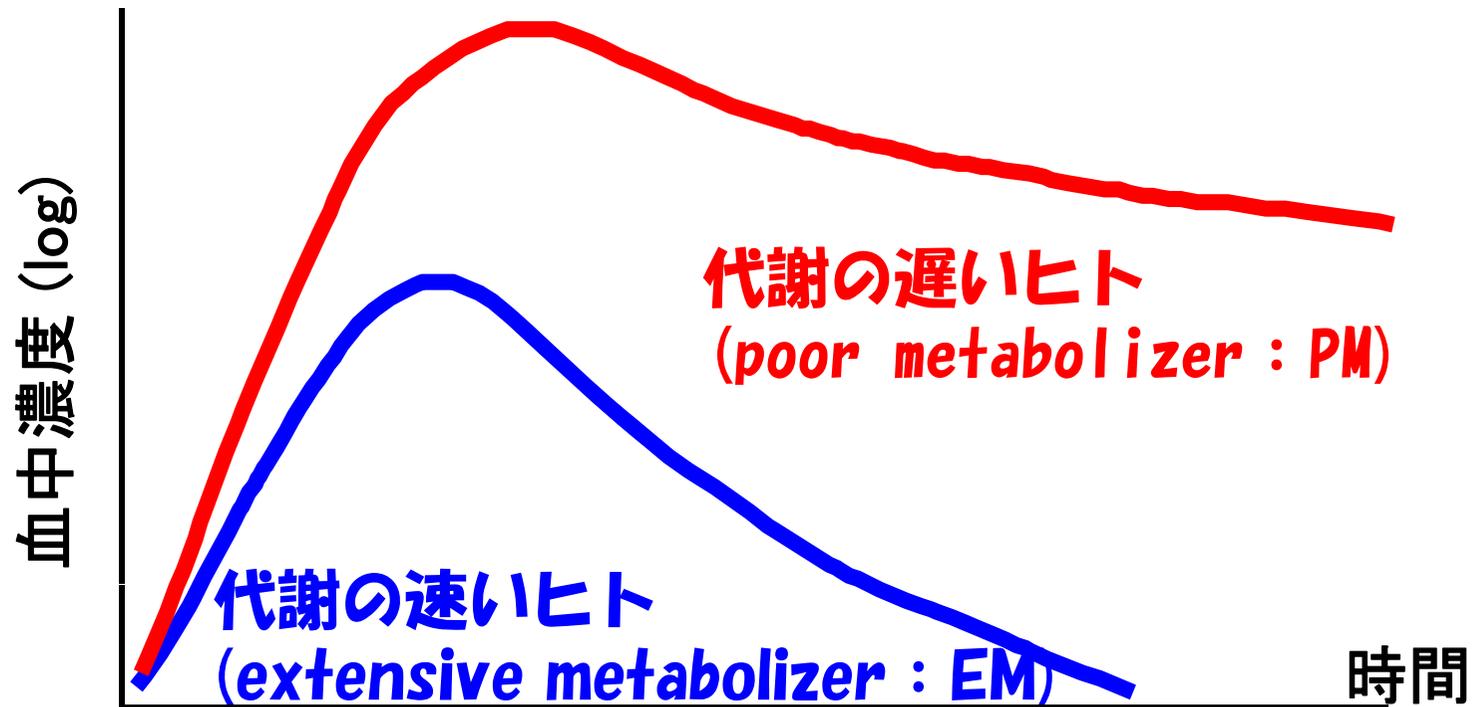
背景：遺伝子と薬の関わり

医薬品の効果や副作用発現の個人差は、臨床上最も重要な問題の一つである。既存薬に対して有効性を示さない患者が通常25～30%、抗ガン剤では、多ければ70%以上存在する。医薬品の効果や副作用発現を決定する重要な因子に、薬物代謝酵素活性の個人差がある。この個人差は、遺伝あるいは年齢、性差、食餌、併用薬などによって生じる。

また、遺伝子多型により薬物代謝活性に差があることが知られているものとしてcytochrome P450 (CYP) 2C19がある。この遺伝子型では、正常な活性を示す個体extensive metabolizer (EM)、活性がほとんどない個体poor metabolizer (PM)が存在する。近年、*Helicobacter Pylori* 除菌治療にCYP2C19遺伝子多型が影響を及ぼすことも知られている。



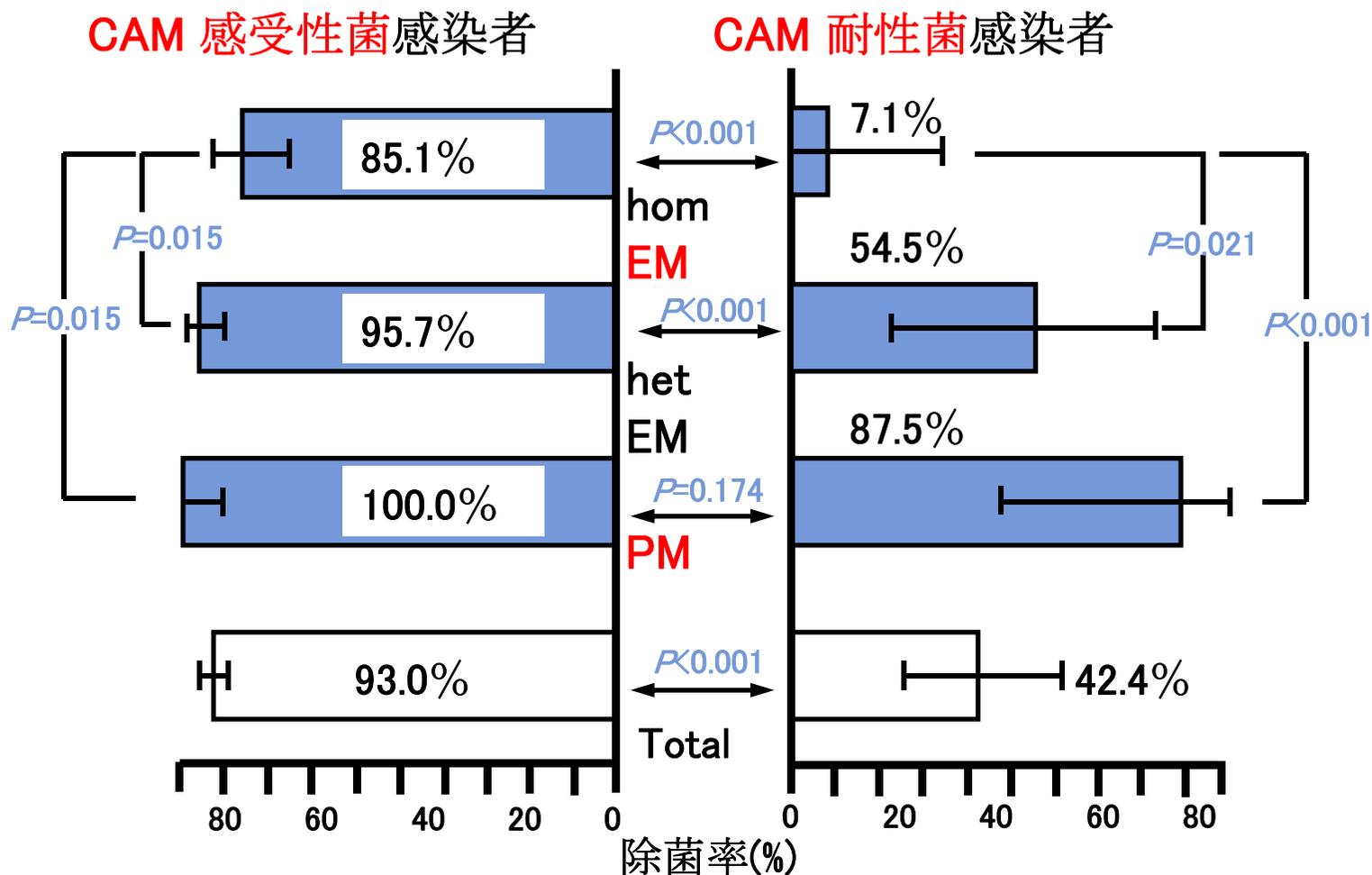
薬物代謝酵素の遺伝的欠損と薬物動態



- ④ 遺伝的な酵素の欠損によるAUC の変化は10 ~100 倍以上

AUC: area under the plasma concentration–time curve

ピロリ除菌療法におけるCYP2C19遺伝子型の影響



ランソプラゾール (LPZ) 60 mg + アモキシシリン (AMPC) 1500 mg + クラリスロマイシン (CAM) 600 mg/日 (or オメプラゾール 40 mg) × 1週間による除菌率 対象: *H. Pylori* 陽性胃潰瘍あるいは胃炎患者 261 名

Furuta T. et al. Clin Pharmacol Ther 69:158-68,2001

本論文他多くの臨床研究により、「CYP2C19遺伝子多型検査に基づくテーラーメイドの*H.pylori*除菌療法を含む消化性潰瘍治療」は、2007年3月に厚生労働省により先進医療として認定された。

目的

- 大学の実験を体験する。
- CYP2C19の遺伝子多型において、実際に自分たちの遺伝子型はどのようなものか？を知る。
- CYP2C19遺伝子多型が及ぼす影響について考える。



実験方法

～SWAB法によるDMA抽出～

➤SWAB法(口腔粘膜細胞採取法)

検体採取

- 歯磨きを行い、口をゆすいだ。
- 紙軸抗菌加工綿棒(当研究室では阿蘇製薬(株)社製:一本化包装ベビー綿棒)で、両頬裏を2分間広い範囲でこすりとった。
- ドライヤーで綿棒を乾かした。

SWAB法の利点

当方法は、簡便で被験者の痛みを伴わず患者本人が自宅で検体を採取して郵送することも可能であることから、健常・ボランティア・小児・神経精神疾患患者を対象とした研究において被験者の同意を得ることが容易である。

DNA抽出法

- 検体番号を1.5mLチューブにふった。
- はさみ(エタノールで消毒)で綿棒の先を切り、対応する1のチューブに入れた。
- この時、綿棒の先になるべく触らないようにした。
- 50mM NaOH溶液を600 μ L加え、1分間激しく攪拌した。(ボルテックス、フラッシュをすること)
- 95°Cで30分間温める。この時、ふたが開かないように注意した。
- 冷めてから、1M TE溶液(pH8.0)を60 μ L加えて、10秒間転倒混和した。
- 綿棒の先端をピンセット(エタノールで消毒)で取り除き、残液をDNA試料とする。



実験方法

～CYP2C19の遺伝子型判定～

➤ 遺伝子型判定 (PCR-RFLP) の方法

CYP2C19*2(*3の場合は、反応液A,B,Eがそれぞれ反応液C,D,Fとなる。)

～PCR～

- 反応液A 19 μ Lを96wellプレートに分注した。
- 反応液B 15 μ Lを96wellプレートに分注した。
- AにはSample DNA(血液)を1 μ L、BにはSample DNA(SWAB)を5 μ L入れて、ピペッティングした。
- 96wellプレートにキャップをして、サーマルサイクラーへ。(サーマルサイクラーにてPCRを約3時間)

～RFLP～

- 反応液E 10 μ Lを96wellプレートに分注した。
- Eに、PCR産物を10 μ L加えて、ピペッティングした。
- 96wellプレートにキャップをして、サーマルサイクラーへ。(サーマルサイクラーにてRFLPを約4時間)

～遺伝子型判定～

- RFLP溶液10 μ Lをゲルに流す。(電気泳動)
- 遺伝子型の判定



実験プロトコール

遺伝子名: CYP2C19 *2 (m1, exon5)

Primer 3: 5'-AAT TAC AAC CAG AGC TTG GC-3'

Primer 4: 5'-TAT CAC TTT CCA TAA AAG CAA G-3'

遺伝子名: CYP2C19 *3 (m2, exon4)

Primer 1: 5'-AAC ATC AGG ATT GTA AGC AC-3'

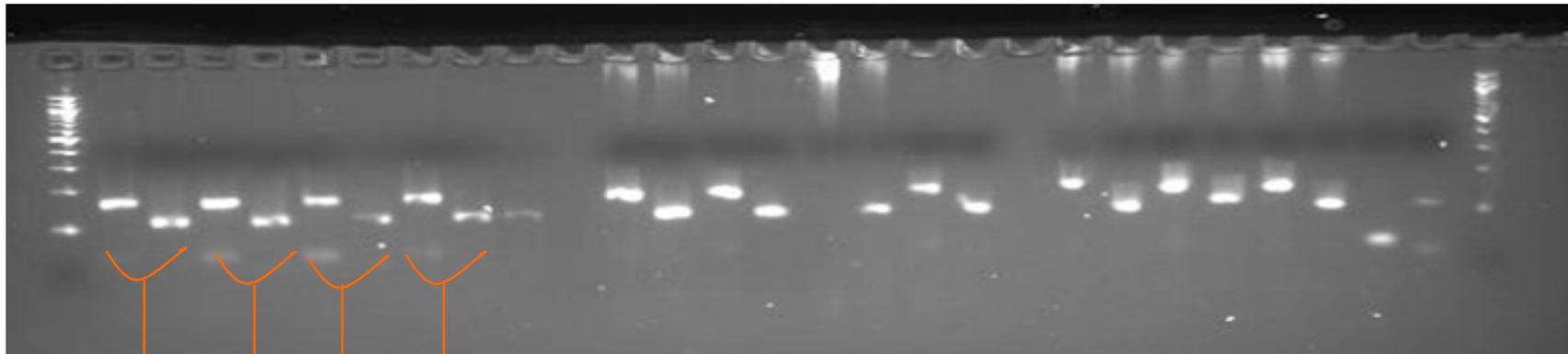
Primer 2: 5'-TCA GGG CTT GGT CAA TAT AG-3'

(Kubota et al. Clin Pharmacol Ther 1996; 60: 661-6. de Morais et al. J Biol Chem 1994; 269: 15419-22.)

PCR反応液組成 (血液・SWAB)		RFLP反応液組成	
Nuclease free water 8.5μL(4.5μL)	} 反応液A (B) [*2] 反応液C (D) [*3]	Nuclease free water 7.5μL	} 反応液E [*2] 反応液F [*3]
2 × GoTaq Green Master Mix 10.0μL		10 × buffer 2.0μL	
Primer mix (10μM each) 10.0μL		制限酵素 (10unit/μL) 0.5μL	
Sample DNA (0.1μg/μL) 1.0μL(5.0μL)		PCR product 10.0μL	
.....		
Total 20.0μL		Total 20.0μL	
PCR反応条件		RFLP反応条件	
CYP2C19*2	CYP2C19*3	37°C 1hr × 4 cycles	
熱変性: 94°C × 5min	熱変性: 94°C × 5min	電気泳動 3%アガロースゲル (Agarose: Nusieve GTG Agarose = 2:1) サンプル量: 10μL/レーン 分子量マーカー: 3μL/レーン	
↓	↓		
熱変性: 94°C × 30sec	熱変性: 94°C × 1min		
↓	↓		
アニール: 57°C × 1min	アニール: 57°C × 1min		
↓	↓	30 cycle	
伸張反応: 72°C × 1min	伸張反応: 72°C × 2min		
↓	↓		
伸張反応: 72°C × 5min	伸張反応: 72°C × 5min		

結果①

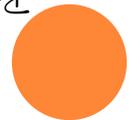
～PCR産物の電気泳動～



塚本
大寺
上野
桶田

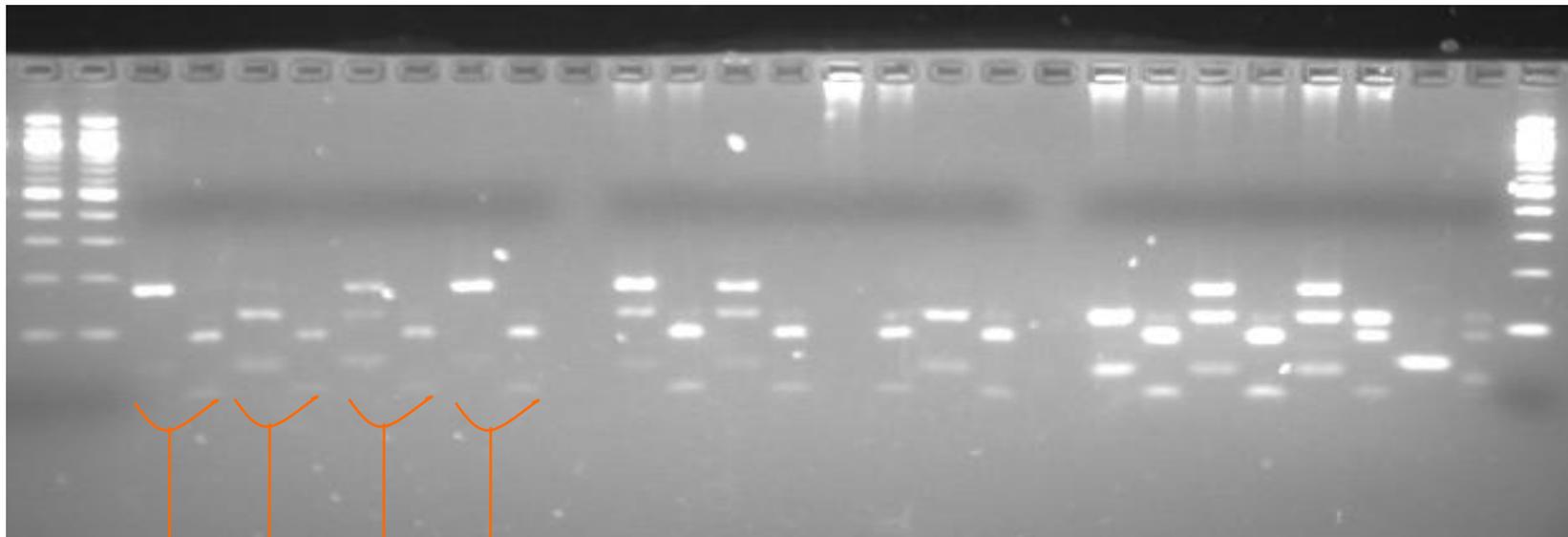
左側が*2、右側が*3

PCRにより、目的の部位のDNAを増幅した。
今回、自分たちのPCR産物を泳動してみて、バンドが見えていた。
これにより、SWAB法できちんとDNAがとれていることと、PCRができていることを確認した。



結果②

～RFLP溶液の電気泳動～



塚本
大寺
上野
桶田

左が*2、右が*3。

	*2	*3		CYP2C19
塚本	ミュータント	ワイルド	→	PM
大寺	ワイルド	ワイルド	→	EM
上野	ヘテロ	ワイルド	→	heteroEM
桶田	ミュータント	ワイルド	→	PM



考察、感想

★実験は、初めて行った実験ばかりで分からないことが多々あったが、なんとなく全体像がつかめたので、これからの勉強に役立てていきたい。

私は判定でPMだったので、薬物を体にいれるときは、吟味して使おうと思った。自分の薬物代謝酵素CYP2C19の遺伝子型が知れてよかった。

桶田慧子



★DNAを抽出するということは初めてのことで、とてもわくわくした。

実験の内容は難しかったけれど、実際に研究室で普通では体験することのできない貴重な経験をすることができた。自分のCYP2C19の型はEMだったので、とても代謝が良いのだとわかった。この企画に参加できてよかった。

大寺真未



★私のCYP2C19の遺伝子型はPMで、代謝が低いのでPPIなどの摂取量には気をつけたいと思う。

遺伝子型には、EM,PMなどいろいろな型があるので、テーラーメイドの医療を進めることは大切だと分かった。

今回薬学部に来て、高校では扱わない器具や薬品が使えたことはこれからの勉強にも経験となった。

塚本 舞



★私は薬学部がどのようなことをやっているのか興味があつて、今回の研修に参加した。実験は思っていた以上に本格的なもので、とても難しかった。でも、やったことのない実験をたくさんさせてもらって楽しかった。

今回の実験はDNAの中のCYP2C19について調べた。私はヘテロEMという結果だった。私は今まで薬について深く考えたことがなかったが、これからはきちんと薬を選びたい。 上野希枝

