

論文内容の要旨

論文題目： **The contribution of opioid-related gene polymorphisms to the individual differences in sensitivity to drugs**

(薬物感受性個人差に対するオピオイド関連遺伝子多型の寄与)

氏名： 西澤 大輔

【背景】

喜怒哀楽といった情動はヒトの精神機能の中で極めて重要なものの一つである。人類は太古の昔から自然界に様々な精神活性物質を見出し、その精神活性作用を儀式用の意識変容物質、医薬品、嗜好品などとして利用してきた。特に、モルヒネ、コカイン、アルコールなどの快情動を生み出す精神活性物質に関しては、麻薬としてのみならず、鎮痛やストレス解消などの目的で今日の医療現場や日常生活においても広く利用されている。オピオイド系鎮痛薬に代表されるオピオイド物質は、鎮痛効果を持つと同時にその報酬・依存作用により依存症の原因となり得る。また、このような薬物感受性には大きな個人差があることが知られているが、そのメカニズムはまだ明らかになっていない部分が多い。そこで本研究においては、オピオイド関連遺伝子の多型がこのような作用の個人差に与える影響に関して解析した。

【ミューオピオイド受容体遺伝子 A118G 多型とアルコール依存症との関連】

オピオイド受容体のサブタイプ的一种であるミューオピオイド受容体の遺伝子 (*OPRM1*) の翻訳領域における A118G 多型は、Asn から Asp へのアミノ酸置換を伴い、リガンド結合能を増加させることが報告されている。*Oprm1* 欠損マウスではエタノール報酬効果が減弱していることから、*OPRM1* 多型がアルコール依存脆弱性と関連する可能性が考えられる。そこで本研究においては、A118G 多型の遺伝子型頻度を、日本の一地域におけるアルコール依存症の患者と同地域の健常者の間で比較し、この多型がアルコール依存脆弱性と関連するか否かを調べた。その結果、この多型に関しては、アルコール依存症患者では健常者に比べて A/A の遺伝子型に対して G アリル保有者の割合が有意に高かった (表 1)。このこ

とから、*OPRM1* の A118G 多型における G アリルはアルコール依存症と有意に関連し、このアリルはアルコール依存の危険因子の一つであることが推測された。

表 1 *OPRM1* A118G 多型とアルコール依存症との関連

<i>OPRM1</i> A118G	N	Genotype			
		A/A	A/G	G/G	A/G + G/G
Alcohol dependence	64	12 (18.75)	37 (57.81)	15 (23.44)	52 (81.25)
Control	74	26 (35.14)	33 (44.59)	15 (20.27)	48 (64.86)
OR versus A/A		1	2.43	2.17	2.35
95% CI			1.06-5.57	0.81-5.83	1.07-5.16
χ^2			4.50	2.38	4.62
P			0.034*	0.123	0.032*

括弧内は百分率を表す。「*」は「 $P < 0.05$ 」を示す。

【GIRK チャンネル遺伝子多型が鎮痛薬感受性・依存症脆弱性個人差に与える影響】

オピオイドの鎮痛・報酬・依存作用発現においては、受容体の下流にあるエフェクターの一種、G 蛋白質活性型内向き整流性カリウムチャンネル (GIRK チャンネル) がその鍵となる重要な分子であることが、近年の研究により明らかになった。しかし、GIRK チャンネルに関しては、国内外を問わず、鎮痛作用や報酬・依存作用の個人差との関連を示す多型の報告は無い。そこで本研究においては、GIRK チャンネル遺伝子の多型を網羅的に探索し、選出した多型に関して表現型となる鎮痛薬感受性・依存症脆弱性との相関を調べる一方、その多型の効果を調べるための *in vitro* の解析を行った。

1) 検体収集

本研究における遺伝子多型解析のために収集した検体は、主に下記の 3 種類である。

- (i) 外科手術後の疼痛に対してオピオイド系鎮痛薬を投与された患者
- (ii) アルコール・覚醒剤 (メタンフェタミン) などの依存症患者
- (iii) 健常者 (収集時圧刺激・冷水刺激テストを実施し、各個人の痛みの感受性の閾値を測定)

2) 連鎖不平衡解析及び解析多型の選定

これまでのところ、ヒトでは *GIRK1*~*GIRK4* の 4 サブユニットが同定されているが、

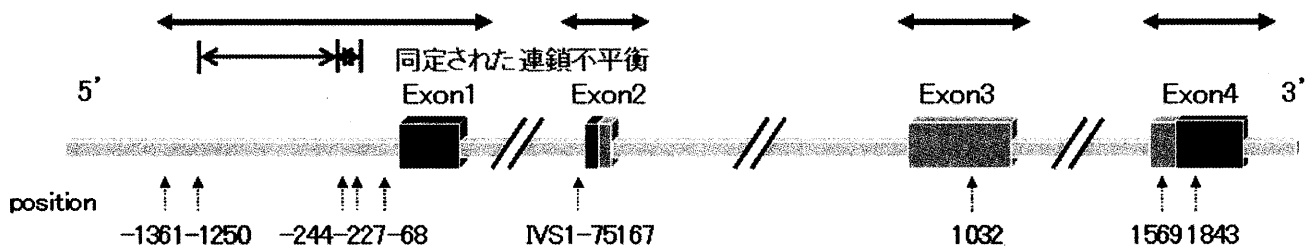


図 1 *GIRK2* における連鎖不平衡解析及び解析多型の選定

紫矢印は本研究において多型スクリーニングを行った領域、数字は同定された多型の position、赤数字は解析対象に選定した多型、をそれぞれ示す。

このうち *GIRK1*~*GIRK3* の遺伝子領域に関する多型の網羅的探索により、*GIRK1* に 6 SNPs、*GIRK2* に 9 SNPs、*GIRK3* に 10 SNPs が同定された。*GIRK1* のプロモーター領域及び Exon1 の 3 SNPs の間に、*GIRK2* のプロモーター領域の 3 SNPs の間に (図 1)、また *GIRK3* のプロモーター領域及び Exon1 の各 2 SNPs ずつの間に連鎖不平衡ブロックが同定された。*GIRK1* において同定された 6 SNPs はいずれもアリル頻度が 0.10 以上のコモンな SNPs ではなかったため対象から外し、*GIRK2* におけるマイナーアリル頻度が 0.385 及び 0.344 の、各 G-1250A (連鎖不平衡ブロックの TagSNP) 及び A1032G の 2 SNPs に加え、*GIRK3* における非同義多型の C1339T を解析対象多型として選定した。これらに関して PCR-RFLP 法などにより各検体を用いて遺伝子型を決定した。

3) 関連解析

(iii) の健常者に関して、痛みの感受性の閾値と多型との相関を調べたが、統計学的に有意な関連は見られなかった。このことから、*GIRK* チャネル遺伝子多型が、内因性オピオイド機能個人差に伴って変化すると考えられる痛み感受性個人差に与える影響は無いと考えられた。

しかし、(i) の患者における術後の鎮痛薬投与必要回数との関連を解析したところ、鎮痛薬投与必要回数に関しては、図 2 に示すように、*GIRK2* A1032G 多型について G アリルを保有する患者群は、保有しない患者群と比較して、投与必要回数が有意に少なかった。この結果より、*GIRK2* A1032G 多型は外因性オピオイド物質に対する応答の個人差に寄与すると考えられ、この多型における G アリル保有者では *GIRK* チャネルの鎮痛作用が亢進している可能性が示唆された。

さらに、(ii) の覚醒剤 (メタンフェタミン) 依存症の患者と (iii) の健常者の間で遺伝子型頻度及びアリル頻度を比較したところ、表 2 に示すように、覚醒剤依存症患者では *GIRK3* C1339T 多型の T アリル頻度が有意に高いことが示された。この結果より、このアリルは覚醒剤依存の危険因子の一つであることが推測され、この多型における T アリル保

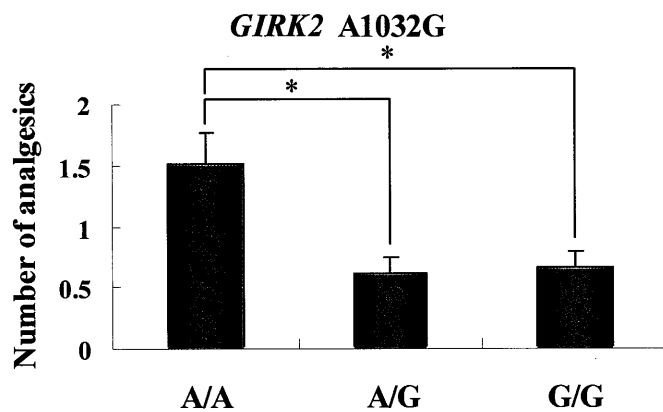


図 2 *GIRK2* A1032G 多型と鎮痛薬必要回数との関連
[*] は「 $P < 0.05$ 」を示す。

表 2 *GIRK* 多型と覚醒剤依存症との関連

	N	Genotype			P	Allele frequency		P
		G/G	G/A	A/A		G	A	
<i>GIRK2</i> G-1250A								
Controls	303	45	141	117	0.368	0.381	0.619	0.526
Patients	221	24	112	85		0.362	0.638	
<i>GIRK2</i> A1032G								
Controls	203	20	98	85	0.743	0.340	0.660	0.903
Patients	221	26	100	95		0.344	0.656	
<i>GIRK3</i> C1339T								
Controls	267	156	97	14	0.033*	0.766	0.234	0.014*
Patients	208	104	81	23		0.695	0.305	

[*] は「 $P < 0.05$ 」を示す。

有者では GIRK チャンネルの報酬作用が亢進している可能性が示唆された。

4) *in vitro* 解析

アフリカツメガエル卵母細胞実験系を用い、非同義置換である *GIRK3* C1339T 多型のチャンネル活性に与える効果を調べた。*GIRK3* は *GIRK1* とヘテロメリックチャンネルを形成するので、これらを卵母細胞上に共発現させ、*GIRK* チャンネルのアゴニストであるエタノール (EtOH) の活性化効果を試した。その結果、1339T 型のチャンネルは 1339C 型のチャンネルに比べ高い活性化効果を示し (図 3)、1339T 型は高活性型 *GIRK* チャンネルであると考えられた。

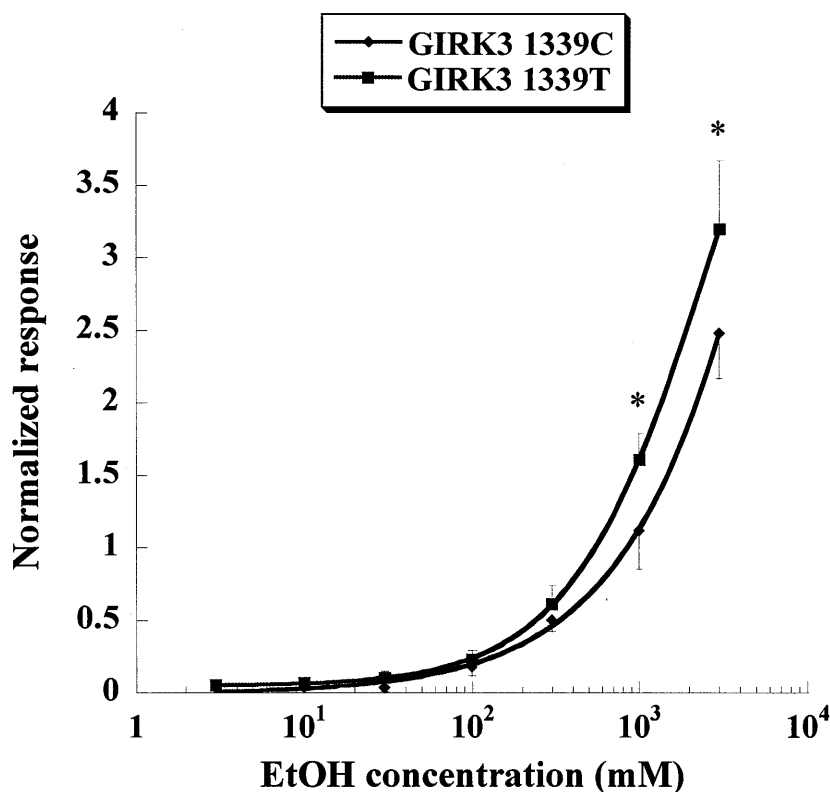


図 3 *GIRK3* C1339T 多型によるチャンネル活性の変化

EtOH の *GIRK1/3* に対する濃度 - 反応関係。「*」は「 $P < 0.05$ 」を示す。

【まとめ】

本研究により、ミューオピオイド受容体遺伝子 *OPRM1* の A118G 多型における G アリルはアルコール依存の危険因子の一つとなり得ることが示された。また、*GIRK* チャンネル遺伝子多型 *GIRK2* A1032G が、外科手術時の鎮痛薬投与必要回数と関連することがわかった。さらに、*GIRK3* C1339T 多型の T アリルは覚醒剤依存症患者に高頻度で認められた。アフリカツメガエル卵母細胞実験系を用いた *in vitro* の解析においても 1339C 型のチャンネルに比べ 1339T 型チャンネルはアゴニストに対して高い応答を示したので、これは高活性型 *GIRK* チャンネルであると考えられた。

このように、本研究において、薬物感受性個人差に寄与すると考えられる複数のオピオイド関連遺伝子多型を同定することができた。本研究においては日本人集団のみで関連研究を行ったが、今後は他集団・他民族を含めた詳細な解析を行うことにより、人類集団間での遺伝的変異や薬物感受性の差異、また環境との相互作用などに関して新たな知見が得られるものと期待される。