

## 論文の内容の要旨

論文題目 「薬剤感受性の個人差を規定する遺伝子多型の探索方法の研究」

氏名 辰野 健二

【目的】薬の効果や副作用の現れ方には個人差があり、その機構を解明することは、医薬品の有効性と安全性の向上、臨床試験の効率化、および医療経済面からも重要な課題となっている。こうした薬剤感受性の個人差は遺伝子多型の影響を受けていると考えられており、一部の薬剤では薬剤代謝酵素に存在する遺伝子多型を調べることで効果や毒性の出現を予測できるようになってきた。しかしながらこれまでの遺伝子多型の探索は、薬剤の標的分子や薬剤代謝酵素などに限定されており、そのような遺伝子の多型では説明しきれない場合も多い。薬剤感受性は多数の因子が複雑に関連していると考えられており、遺伝子を限定した探索ではその機構を詳細に解明することは困難である。また臨床事例で解析できる薬剤の種類と数には限りがあり、多くの薬剤に存在する潜在的な感受性の個人差の機構を解明することはできない。

不死化リンパ球細胞株(LCLs)を用いた薬剤感受性測定モデルは、人への薬剤投与が不要なために解析対象とする薬剤が限定されず、多様な薬剤の感受性を測定できる系である。本研究はこのモデルを用い、ゲノムワイド連鎖解析などの遺伝子網羅的な解析手法によって薬剤感受性に関連する遺伝子の探索を行い、その手法の有効性を検討したものである。

【方法】連鎖解析は5家系の CEPH 由来の LCLs を用いて行った。薬剤感受性の測定は、多数の細胞株の同時処理や複数薬剤での感受性試験を繰り返し実施可能とするために、細胞株を一枚の 96well プレートに集めた LCLs パネルを用いたハイスループット測定系を構築して行った。この測定系を用い、代表的な抗癌剤である 5-フルオロウラシル、パクリタキセル、およびカンプトテシンの LCLs に対する細胞毒性を測定した。

連鎖解析に使用する遺伝子多型マーカーは SNP を用いた。5家系の CEPH サンプルよりゲノム DNA を抽出し、Affymetrix 500K SNP アレイを用いてタイピングを行った。得られた3世代の SNP 情報から創始者が判定できる SNP を用い、Lander & Green のアルゴリズムと比較して精度が高い組換え地図を作成した。組換えに矛盾すると考えられる SNP はタイピングエラーとして除外した informative SNP を用い、Haseman-Elston 法での同胞 QTL 解析を行い薬剤感受性と連鎖する領域を求めた。

【結果および考察】薬剤感受性には多数の因子が関わっていると考えられているので、遺伝解析によって原因となる遺伝子を同定するには多数のサンプルを収集し解析する必要がある。本研究で構築した LCLs パネルでのハイスループット測定系は、多数のサンプルでの測定を精度よく行うことを可能としたものである。感受性モデルとして用いた LCLs はリンパ球由来の細胞株で同じ操作によって不死化された細胞株であるので、測定さ

れた薬剤感受性の variation は遺伝子の個人差を反映していると考えられた。今回測定した種の抗癌剤はそれぞれ作用機序の異なる薬剤であるが、これらの3薬剤同士の感受性に相関関係が認められたことは、感受性を決める因子のなかに共通する因子が存在することを示唆している。

マイクロアレイ法による SNP タイピングはゲノム全域にわたる情報が高密度に得られるが、同時に相応量のタイピングエラーが含まれてしまう。これを用いて IBD (Identical by descent) を計算した場合、非常に狭い領域で IBD が変動するノイズが現れて正確に算出できていないことがわかった。エラーを除去した informative SNP を用いて算出した場合にはノイズが消え、IBD が 0, 1, 2 のいずれかに確定していた。一方公共データベースからダウンロードしたマイクロサテライトマーカーのタイピングデータを用いて IBD を算出した場合は、情報量が少ないために IBD が確率的にしか求まらない領域や、狭い領域では IBD の変化を検出できない場合があることがわかった。これらの IBD を用いて連鎖解析を行った場合、IBD のノイズがそのまま連鎖解析での p-value のノイズとなって現れ、誤った領域を連鎖領域と判定してしまう可能性があった。また、マイクロサテライトマーカーでの連鎖解析は informative SNP での連鎖解析を比較して検出力が低いことが推定された。

Informative SNP を用いた連鎖解析により、抗癌剤3種の感受性を連鎖する領域が複数同定された。これは、5家系のサンプルでの解析では不十分で偽陽性の領域が含まれた可能性は残るが、薬剤感受性には多数の遺伝子が関わっていることを反映したものと考えた。連鎖領域には複数薬剤の感受性と連鎖する領域と、1薬剤のみが連鎖する領域の双方が存在し、連鎖解析からも感受性に関わる薬剤共通の因子の存在が示唆された。3薬剤が共通する連鎖領域は 11q23.3-24.1 に存在したが、この領域は PTX、CPT の2薬剤でもっとも小さな p-value を示した領域 ( $3.32 \times 10^{-4}$ 、 $1.78 \times 10^{-4}$ ) でもあった。

【結論】LCLs パネルを用いたハイスループット測定系を用いることで、多数のサンプルの薬剤感受性を繰り返し精度よく測定することが可能となった。500 K SNP タイピングアレイから得られた高密度の SNP データから informative SNP を選び出す手法を考案し、informative SNP による連鎖解析が有効であることを示した。Informative SNP による連鎖解析により 5-フルオロウラシル、パクリタキセル、およびカンプトテシン3薬剤の感受性に共通に連鎖する領域として 11q23.3-24.1 を同定した。