

CYP2A6遺伝子多型の測定法の検討

○ 鈴木 玄樹 (株式会社LSIメディエンス 医薬品分析部)

目的・背景

CYP (シトクロムP450) :

- 主に肝臓で発現し、異物、薬剤代謝に関与。多種類存在し、基質特異性、誘導性が異なる。
- その内の一つCYP2A6は代謝活性の個人差が大きく、遺伝子型に依存する。

CYP2A6の基質 :

- ニコチン (タバコ)、レトロゾール (閉経後乳癌治療剤)、テガフル (抗癌剤) 等
- 日本人、アジア人では*4 (欠失)、*7 (活性低下) および*9 (転写活性低下) のアリル頻度が高い
⇒ PM (Poor Metabolizer) の頻度が高い

Allile	Caucasian	Japanese
CYP2A6*4	0.00	0.19
CYP2A6*7	0.00	0.00~不明
CYP2A6*9	0.05	0.28

従来のCYP2A6遺伝子型測定法は比較的煩雑である。

本検討では、酵素活性に影響し、高アリル頻度の*4,*7について、簡便、正確な測定法を開発し、既存*9測定法と合わせて、CYP2A6表現型を予測できるレディメイドの系を構築する。

検討内容

CYP2A6*4 (欠失)	従来法 RFLP法	従来法 TaqMan Copy Number Assay	新規手法
手法	PCR ⇒ 制限酵素処理 ⇒ 電気泳動	リアルタイムPCR	前処理 ⇒ リアルタイムPCR
所要時間 (抽出含まず)	7~8時間/96検体	~3時間/12検体	~5時間/96検体
試薬コスト (概算)	1	2	0.7
	▲目視判断要	▲N=4推奨 ▲要参照遺伝子	◎目視判断不要 ◎参照遺伝子不要

CYP2A6*7 (rs5031016 SNP)	従来法 シーケンス法	新規手法
手法	PCR ⇒ シーケンス	前処理 ⇒ リアルタイムPCR
所要時間 (抽出含まず)	8~9時間/48検体	~5時間/96検体
試薬コスト (概算)	1	0.2
	▲長時間、高コスト	◎短時間、低コスト

従来の問題点 :

- CYP2A6に酷似した遺伝子がゲノム上に存在し特異的増幅が困難
- *4はCYP2A6を欠失したアリルのため検出が困難

検討内容 :

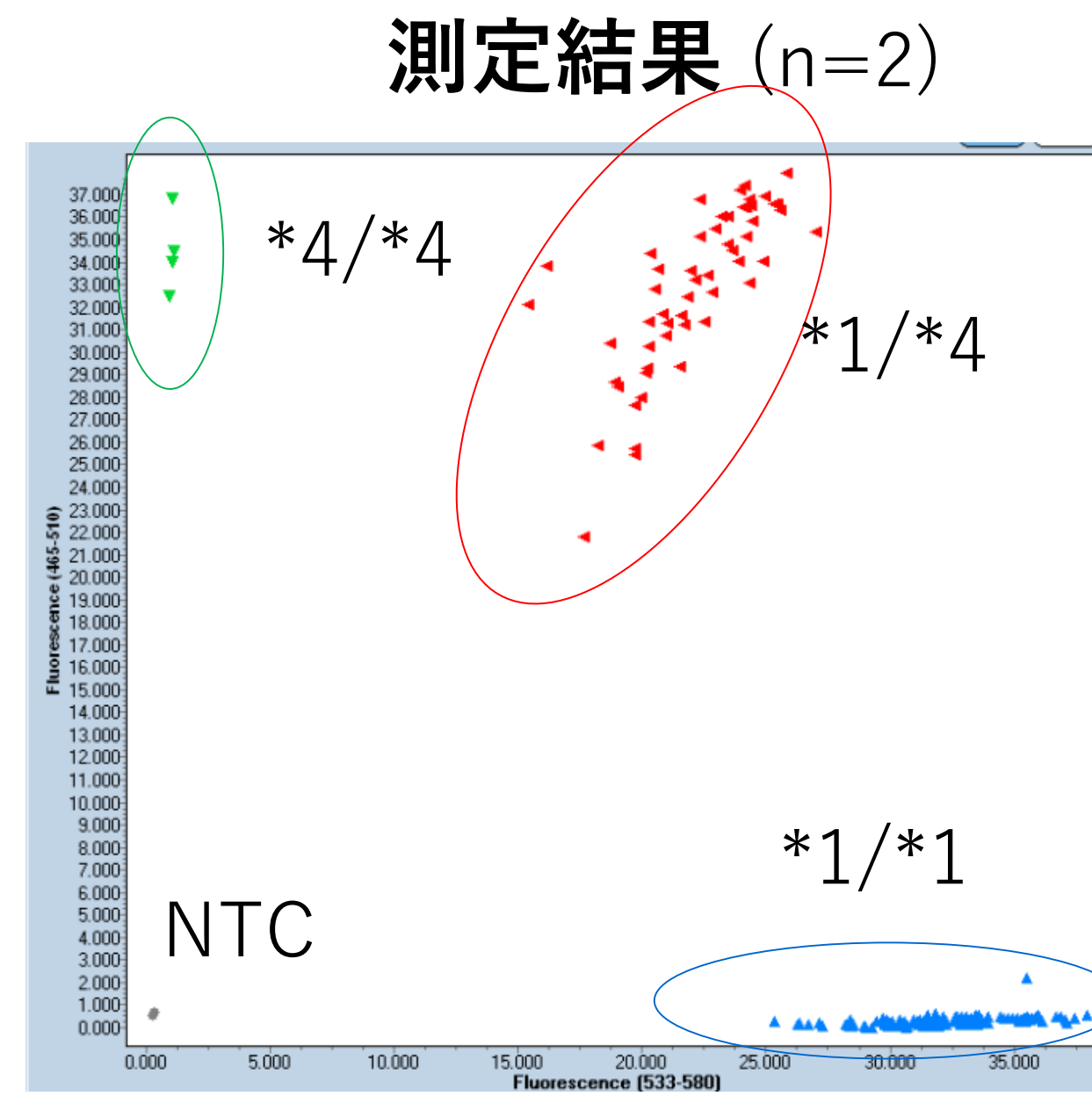
- *1、*4をそれぞれ2色の蛍光値に変換する
- *7:CYP2A6のみ増幅したのち TaqMan Assayを実施
- 遺伝子型既知のDNA使用により検証

まとめ

項目	内容	CYP2A6*4	CYP2A6*7	CYP2A6*9
アリの種類		欠失	点変異	点変異
障壁	相同遺伝子の存在欠失を検出	相同遺伝子の存在	相同遺伝子の存在	-
方法		カスタムプローブ	カスタムプローブ	TaqMan (市販)
正確性	事前情報との一致	○	-	○
	PCR産物の配列確認	-	○	-
頑健性	ソフトウェア自動判定 明瞭なクラスタリング	○	○	○
再現性	Duplicateの同一結果	○	○	○

日本人集団において高頻度、かつCYP2A6の活性低下に関与するアリルは、今回検討した測定法で測定可能である

検討結果 : CYP2A6*4

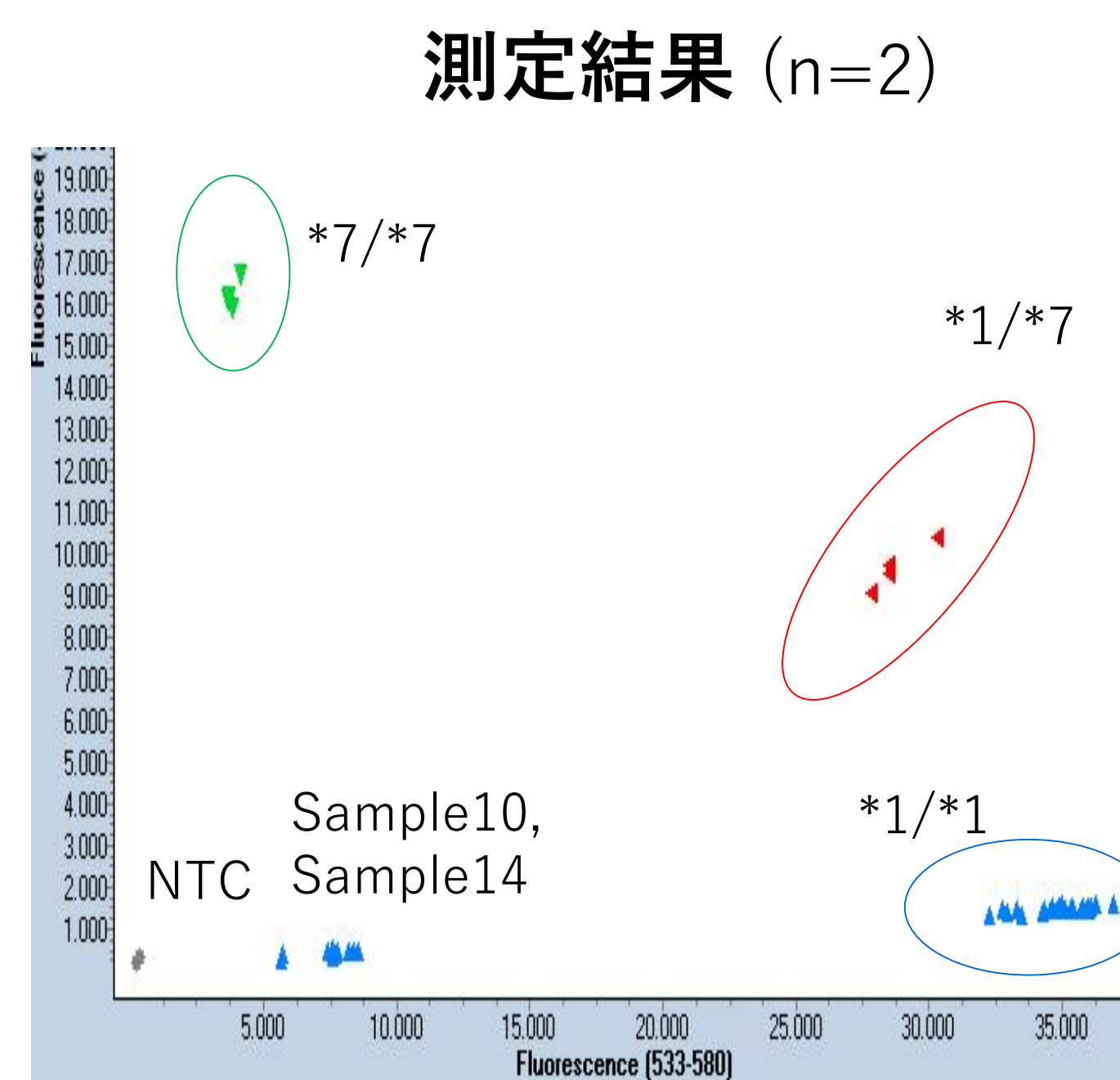


検討用 DNA 90検体

Sample	事前情報	測定値
Sample01	1 0	*1/*4
Sample02	0 1	*1/*4
Sample03	0 0	*1/*1
Sample04	0 0	*1/*1
Sample05	0 0	*1/*1
Sample06	0 1	*1/*4
Sample07	1 0	*1/*4
Sample08	0 0	*1/*1
Sample09	0 0	*1/*1
Sample10	1 1	*4/*4
Sample11	0 0	*1/*1
Sample12	0 0	*1/*1
Sample13	0 0	*1/*1
Sample14	1 1	*4/*4
Sample15	0 0	*1/*1
Sample16	0 0	*1/*1
Sample17	1 0	*1/*4

*1/*1 *1/*4 *4/*4
それぞれを明瞭にクラスタリングできた
・ 判定率 = 100%
・ 事前情報との一致率 = 100%

検討結果 : CYP2A6*7



*1/*1 14検体
*1/*7 2検体
*7/*7 1検体

Sample	*4測定値	*7事前情報	*7測定値
Sample01	*1/*4	Unknown	*7/*7
Sample02	*1/*4	Unknown	*1/*1
Sample03	*1/*1	Unknown	*1/*7
Sample04	*1/*1	Unknown	*1/*1
Sample05	*1/*1	Unknown	*1/*1
Sample06	*1/*4	Unknown	*1/*1
Sample07	*1/*4	Unknown	*1/*1
Sample08	*1/*1	Unknown	*1/*1
Sample09	*1/*1	Unknown	*1/*1
Sample10	*4/*4	Unknown	*1/*1 (低シグナル)
Sample11	*1/*1	Unknown	*1/*1
Sample12	*1/*1	Unknown	*1/*7
Sample13	*1/*1	Unknown	*1/*1
Sample14	*4/*4	Unknown	*1/*1 (低シグナル)
Sample15	*1/*1	Unknown	*1/*1
Sample16	*1/*1	Unknown	*1/*1
Sample17	*1/*4	Unknown	*1/*1

・ それぞれを明瞭にクラスタリングできた
・ 低シグナルのサンプルは*4/*4 (2A6がない) であり、妥当である

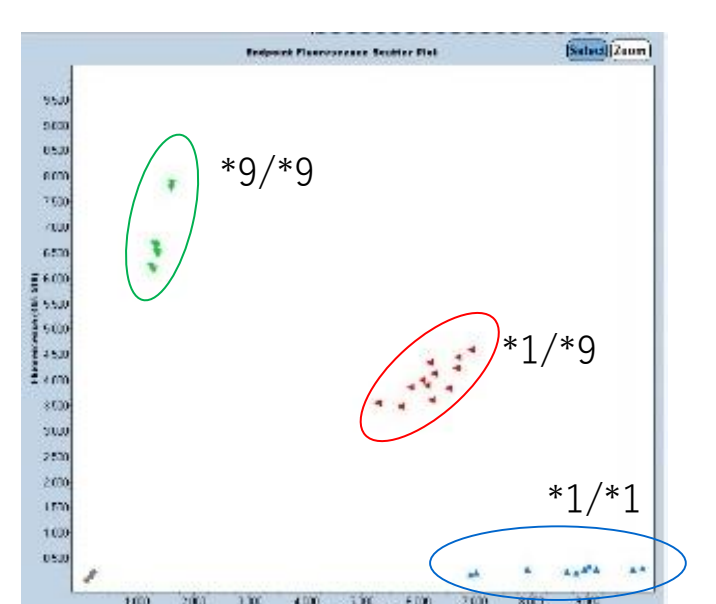
CYP2A6の遺伝子型判定

【遺伝子型判定表】

Sample	*4測定値	*7測定値	*9測定値 (市販)	遺伝子型	表現型予測	*4	*9	*7	判定	表現型予測*
Sample01	*1/*4	*7/*7	*1/*1	*4/*7	PM	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	EM
Sample02	*1/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*4	IM	*1/*1	*1/*1	*1/*7	*1/*7	IM or EM
Sample03	*1/*1	*1/*7	*1/*9	*7/*9	PM	*1/*1	*1/*1	*7/*7	*7/*7	PM
Sample04	*1/*1	*1/*1	*1/*9	*1/*9	IM or EM	*1/*1	*1/*9	*1/*1	*1/*9	IM or EM
Sample05	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	EM	*1/*1	*1/*9	*1/*7	*7/*9	PM
Sample06	*1/*4	*1/*1	*9/*9	*4/*9	PM	*1/*1	*9/*9	*1/*1	*9/*9	PM
Sample07	*1/*4	*1/*1	*9/*9	*4/*9	PM	*1/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*4	IM
Sample08	*1/*1	*1/*1	*1/*9	*1/*9	IM or EM	*1/*4	*1/*1	*7/*7	*4/*7	PM
Sample09	*1/*1	*1/*1	*1/*9	*1/*9	IM or EM	*1/*4	*9/*9	*1/*1	*4/*9	PM
Sample10	*4/*4 (低シグナル)	Negative	Negative	*4/*4	PM	*4/*4	any	any	*4/*4	PM
Sample11	*1/*1	*1/*1	*1/*9	*1/*9	IM or EM	上記以外			Undetermined	
Sample12	*1/*1	*1/*7	*1/*1	*1/*7	IM or EM					
Sample13	*1/*1	*1/*1	*9/*9	*9/*9	PM					
Sample14	*4/*4 (低シグナル)	Negative	Negative	*4/*4	PM					
Sample15	*1/*1	*1/*1	*9/*9	*9/*9	PM					
Sample16	*1/*1	*1/*1	*1/*9	*1/*9	IM or EM					
Sample17	*1/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*4	IM					

測定した17検体すべてについて、矛盾なく遺伝子型を判定し、表現型を予測することが可能であった

*9 (市販プローブ) 検証結果



PM: Poor Metabolizer (活性欠損)
IM: Intermediate Metabolizer (活性低下)
EM: Metabolizer (通常活性)

*Affymetrix DMET annotation