

日本臨床検査自動化学会  
第7回遺伝子検査技術セミナーテキスト

平成18年10月11日(水) 18:00~20:30 レセプションホール(国際会議場)

司会 船渡 忠男 (京都大学医学部保健学科検査技術学専攻情報理工医学講座)  
野村 文夫 (千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学)

テーマ1: HIV薬剤耐性検査の運用と活用 ..... P2

講師 杉浦 互 (国立感染症研究所エイズ研究センター)

テーマ2: 三重大学医学部附属病院におけるオーダーメイド医療部の活動と課題 ..... P6

講師 中谷 中 (三重大学医学部附属病院オーダーメイド医療部)

テーマ3: 固形腫瘍の遺伝子診断 ..... P9

講師 日野田 裕治 (山口大学大学院医学系研究科情報解析医学系学域臨床検査医学分野)

## 薬剤耐性 HIV-1 の遺伝子診断法 その適応と今後の課題

国立感染症研究所エイズ研究センター  
杉浦 互

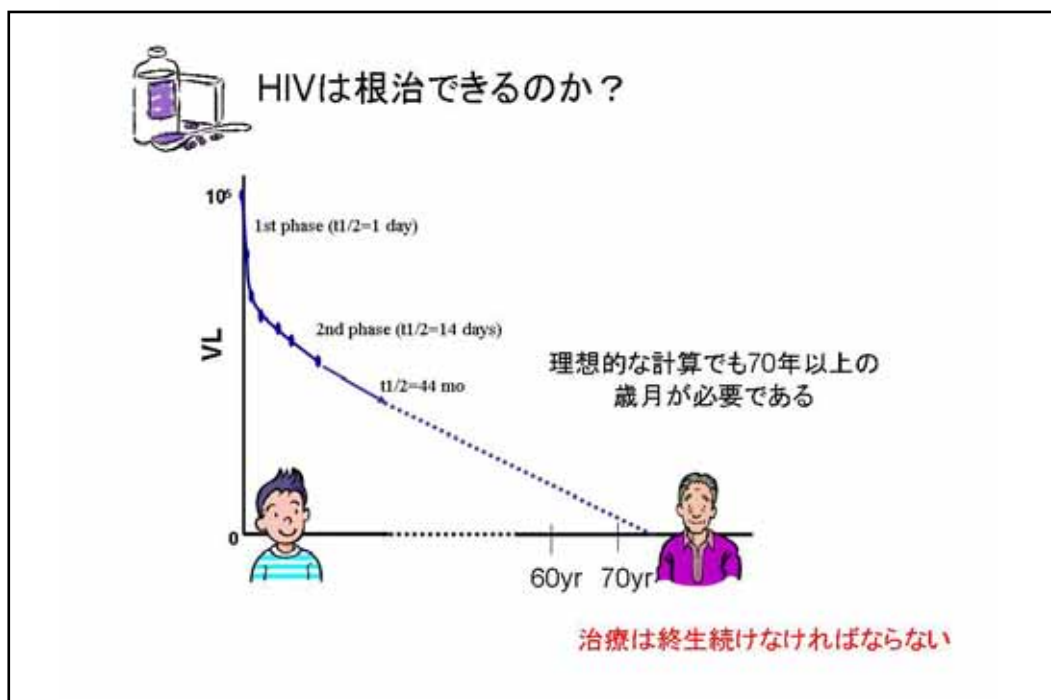
### 1. HIV/AIDS の化学療法とその限界

今日 HIV-1 感染症の治療薬剤として以下 3 クラスの薬剤が使用されている。

- (1)ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor :NRTI)
- (2)非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (non-nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor: NNRTI)
- (3)プロテアーゼ阻害剤(tease inhibitor: PI)

上記のうち 2 クラス、例えば NRTI 2 剤と PI を 1 剤、もしくは NRTI 2 剤と NNRTI を 1 剤組み合わせた多剤併用療法 (highly active antiretroviral therapy: HAART) が標準的な治療法とされている。

HAART は大変優れた治療効果を示し、HIV-1 感染者体内におけるウイルスの増殖をほぼ完全に抑制し、CD4 陽性 T 細胞数の回復をも実現した。しかしながら HAART を受けている感染者体内における HIV-1 の減衰をウイルスの体内動態から推測した結果、体内のウイルスを完全に排除するためには少なくとも 73 年の治療が必要と算出され、HAART をもってしても根治には程遠いことが明らかにされた。



HAART の恩恵を得るのは容易では無く、一旦治療をはじめたら HIV-1 感染者は厳格な服薬、95%以上のアドヒアランスの達成が求められる。近年排泄・代謝の遅い新薬・新剤型の登場により、1日1回の服用でのコントロールが可能となり、随分と負担が軽減されたが、それでも終生飲むことには変わりはない。また、治療薬剤には深刻な副作用を示すものが多数あり、副作用のために服薬中止を余儀なくされる症例も多い。さらに治療薬剤に対して耐性を獲得し

たウイルスの出現も治療を妨げる大きな問題である。報告によれば初回治療患者の実に 20-40%が、前述のような問題でウイルス増殖の押さえ込みに失敗するとされている。その原因の中でも薬剤耐性ウイルスの出現はその後の治療薬剤の選択を大幅に制限するために深刻な問題となっている。

## 2.HIV-1 薬剤耐性獲得の機序

HIV-1 が治療薬剤耐性を獲得しやすい理由は二つあげられる。

- (1) 活発なウイルスの新生：  
一日に  $10^{10}$ 個にも及ぶ新たなHIV-1 粒子が産生される活動的かつ消耗性のウイルス疾患である。
- (2) 低い逆転写精度：  
HIV-1 の逆転写酵素は DNA ポリメラーゼと異なり proof reading 活性を持たないために逆転写の精度が低いことが知られている。RNA が DNA への逆転写過程で変異を起こす頻度は 30 万塩基対に対して 1 回起こりうると推定されている。

## 3.各薬剤クラスにおける耐性変異とその機序

一般に薬剤耐性変異は治療薬剤の標的であるそれぞれの酵素に出現してくる。NRTI と NNRTI は逆転写酵素に、PI ではプロテアーゼにおいて耐性に関する特有の変異が誘導される。

(1)NRTI 耐性化機序：NRTI の耐性化機序には三つの異なる機序の存在が知られている。

取り込み低下 (decreased uptake)

Ex. M184V 3TC 耐性変異。

取り外しの亢進 (excision, pyrophosphorolysis)。

Ex. AZT に対する耐性変異 (Thymidine Analogue resistant mutation: TAM) M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q/E

捕捉の低下

Ex. TDF 耐性変異 K65R

(2)NNRTI 耐性化機序：

薬剤と酵素の結合親和性の低下が耐性化機序

Ex. L100I, K103N, V106A/M, V108I, Y181CY, Y188CLH, G190A, P225H,

P236L

(3)PI 耐性化機序

薬剤と酵素の結合親和性の低下が耐性化機序

Major mutation：耐性レベルに大きく影響を及ぼす

D30N, M46I/L, G48V, I50V, V82AFTS, I84V, L90M。

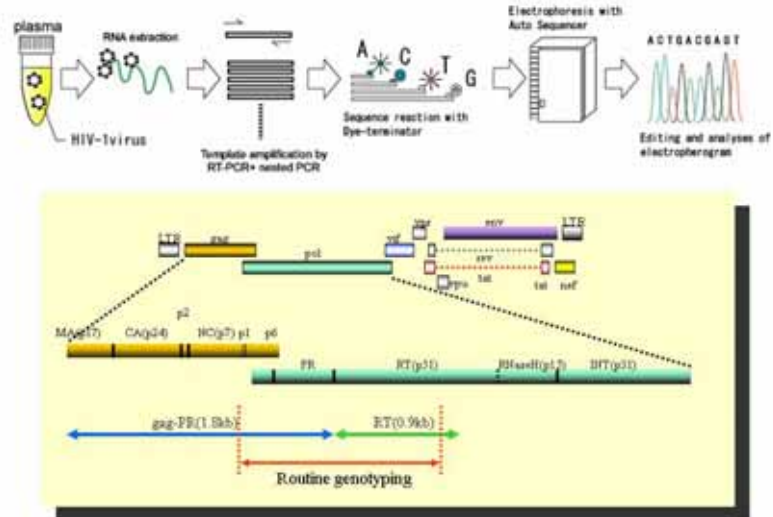
Minor mutation: 耐性レベルの増強、ウイルス増殖能の低下を補う

## 4.HIV-1 の薬剤耐性検査

今日行われている薬剤耐性 HIV-1 を検出する方法には薬剤耐性遺伝子検査 (Genotyping) と薬剤感受性検査 (Phenotype) という二つの手法がある。薬剤耐性遺伝子検査は治療薬剤の標的である逆転写酵素、あるいはプロテアーゼの遺伝子配列を解析することにより耐性の有無を調べる手法である。

## 薬剤耐性遺伝子検査

EDTA 採血



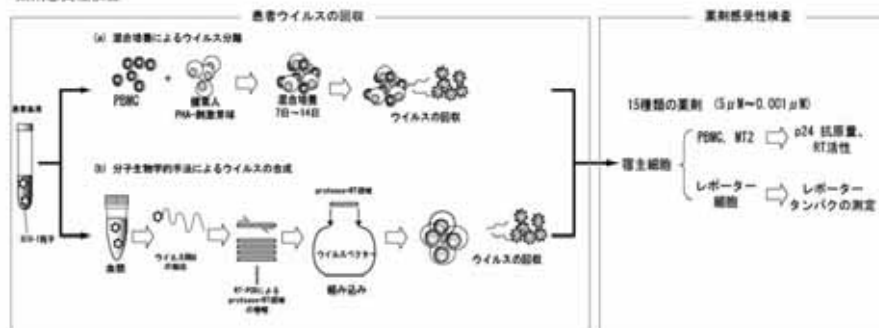
もう一方の手法である感受性検査は遺伝子検査と異なり、実際に HIV-1 の薬剤感受性を試験管内で測定する直接的な評価方法である。この検査の成立には患者由来の HIV-1 を回収することが必要である。

## 薬剤感受性検査の必要性

遺伝子検査による90~95%は耐性の予測が可能である。  
残り5~10%については感受性検査が必要となる。

- 1 長期間の治療により耐性変異および付随する変異が多数在り、変異同士の相互干渉がどのように影響するか予想できない
- 2 Quasispeciesの問題 遺伝子検査だけでは捉えられていない minority population の影響
- 3 新たな薬剤で耐性変異が必ずしも確定していない場合

### 薬剤感受性検査



## 5. 検査の適応

平成 18 年 4 月より薬剤耐性遺伝子検査は保険収載された。保険上の規定として

は「HIV-ジェノタイプ薬剤耐性検査は抗 HIV 治療の選択及び再選択の目的で  
行った場合に3月に1回を限度として算定できる」とされている。現在これに基づいてガイドラインの整備を進めている。

#### HIV-ジェノタイプ薬剤耐性検査の実施が推奨される事例

- (1) 新規診断時(急性感染症例を含む)
- (2) 治療開始(再開)時  
治療前のベースライン検査として必要
- (3) 治療開始後  
3ヶ月から6ヶ月を経過してもコピー数が1000未満に到達していない場合
- (4) 治療中  
薬剤耐性の出現が疑われる場合
- (5) 母子感染  
垂直感染予防を目的として母親に抗HIV薬の予防投与を行う際  
児への感染が確認された際  
予防投与歴のある母親の治療を開始する際
- (6) 針刺し事故など感染者血液に曝露した場合の予防的投与措置  
HIV感染血液への曝露が発生した場合



#### 6. 今後の課題

1996年より本年3月まで薬剤耐性遺伝子検査法は国立感染症研究所および拠点病院、地方衛生研究所などのウイルス研究室において臨床研究という位置づけで実施されてきたが、本年4月に保険収載され、臨床検査として成立することとなった。今後は検査の質の管理が大きな課題となるが、検査の標準化を目指すのが最善の策と考えられる。

標準化のためには以下の事項について取り組む必要がある。

1. 基準測定操作法の設定 → 研究班推奨基準素行低操作法
2. 標準物質(校正物質)の設定 → 研究班実用校正物質
3. 測定値の施設間較差の是正
4. 臨床検査データベースの整備と臨床応用

## 三重大学医学部附属病院におけるオーダーメイド医療部の活動と課題

三重大学医学部附属病院オーダーメイド医療部

中谷 中

ヒトゲノムプロジェクトの完遂とともに、手に入れたゲノム情報を活用してオーダーメイド医療を推進しようという気運が高まっている。これまで研究室レベルであったオーダーメイド医療を、いかにして臨床現場で現実のものにさせるかが課題となっている。三重大学医学部附属病院では、オーダーメイド医療実現化のために、平成 17 年 11 月、**オーダーメイド医療部**を設置した。検査部、薬剤部、診療各科など病院内既存部署の横断的な体制とし、あらゆる遺伝子診断に対応できることを目指した。

現在進行中の主なプロジェクトは、以下の通りである。

- (1) **疾患遺伝子診断**: 家族性腫瘍などの疾患遺伝子診断、遺伝カウンセリングを実施している。
- (2) **生活習慣病感受性遺伝子診断**: メタボリックシンドロームの診断システムを構築中である。
- (3) **薬剤感受性遺伝子診断**: 薬剤代謝酵素遺伝子多型に基づいて、薬剤の効果や副作用を予測し、患者に最適となるオーダーメイド薬物療法を目指している。
- (4) **感染症遺伝子診断**: 様々な感染症の起炎菌を PCR に基づいた遺伝子検査により迅速に同定し、抗菌剤の選択に利用している。

この中でも、オーダーメイド医療の柱とも考えられる薬剤感受性遺伝子診断について、詳しく言及したい。薬剤代謝酵素遺伝子多型解析は数多くなされているが、我々が留意したのは、いかにすれば臨床の現場で利用出来るかという点であった。オーダーメイド化する薬剤としては、代謝経路が明らかにされており、代謝酵素遺伝子多型と酵素活性あるいは薬剤血中濃度との関係にエビデンスがあるものを選択した。解析系の構築上では、研究室レベルでは気にならなかった遺伝子解析の操作性、迅速性、経済性、汎用性などが重要な課題となってきた。そこで、留意したのは以下の点である。

- I. 病院内の既存の設備で解析出来ること
- II. 臨床検査技師間の技術格差が結果に影響を与えないこと
- III. 迅速に結果報告が出来ること
- IV. 診療各科からの様々な要望に、柔軟に対応出来ること
- V. 患者が納得して支払える検査費用であること

以上のことを考慮して、マニュアル操作を出来るだけ回避し、蛍光標識一塩基伸長法 (SnaPshot 法)を中心とした解析系を構築し、種々の検討を実施している。

#### 1.生体肝移植後免疫抑制療法

生体肝移植後の免疫抑制剤としては、タクロリムスないしはシクロスポリンを使用しているが、薬剤選択をチトクローム P450(CYP)3A5 遺伝子多型により行っている。タクロリムスの代謝酵素は主に CYP3A4 であるが、CYP3A5 遺伝子多型が薬剤血中濃度と相関する事が明らかとなってきた。CYP3A5\*1 アレルを有する人はタクロリムスの血中濃度が上昇しにくいいため、その場合にはタクロリムス増量あるいはシクロスポリンを選択するプログラムを実施している。

#### 2.小児急性白血病治療

小児白血病の治療には、mercaptopurine(6-MP)、Methotrexate(MTX)が用いられているが、6-MP は白血球減少、貧血、血小板減少、MTX は汎血球減少、肝機能障害、間質性肺炎、などの副作用があるため、代謝酵素遺伝子多型により副作用を予測しようというものである。MTX 代謝関連酵素 Methylene tetrahydrofolate reductase(MTHFR), Thymidylate synthase(TS)遺伝子多型の組み合わせにより、MTX の薬効、副作用を予測することができると考えられているため、遺伝子型による投与量調節プログラムを構築中である。6-MP 代謝酵素についても、その頻度は高くないが Thiopurine methyltransferase(TPMT)遺伝子多型解析を実施している。

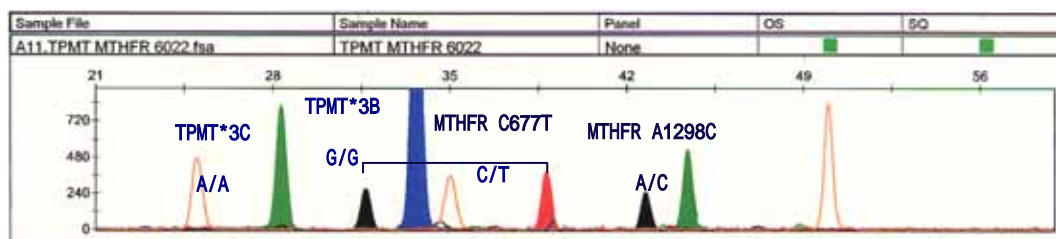


図 MTHFR, TPMT 遺伝子多型一括解析のエレクトログラム

#### 3.慢性関節リウマチ治療

慢性関節リウマチ治療においてもMTXが第一選択薬として使用されているため、小児白血病のときと同様に MTHFR、TS 遺伝子多型によりその副作用を予測出来ると考えている。しかし、白血病治療時に比較して、リウマチ治療時のMTX投与量は極めて少量であり、薬効や副作用発現に異なる機序も想定される。これより、白血病とは独立して投与量調節プログラムを検討中である。

#### 4.ヘリコバクター・ピロリ除菌療法

消化性潰瘍の治療としてヘリコバクター・ピロリ除菌療法が保健適用となっている。

これには、プロトンポンプ阻害剤、アモキシシリン、クラリスロマイシンの三剤併用療法が実施されているが、除菌不成功率が20-40%と増加してきている。原因として、ピロリ菌のクラリスロマイシン耐性が問題とされている。このため、ピロリ菌クラリスロマイシン耐性遺伝子変異を解析する事により薬剤の選択、投与量の設定を検討している。同時に、プロトンポンプ阻害剤代謝酵素CYP2C19 遺伝子多型解析を実施し、プロトンポンプ阻害剤投与量を調節するプログラムを検討している。

#### 5.イリノテカン治療

昨年、米国食品医薬品局(FDA)は、抗がん剤であるイリノテカンは激しい下痢や骨髄抑制といった副作用があるため、その代謝酵素UGT1A1 遺伝子多型に基づいて投与量を調節することを推奨した。我が国ではその通達はまだないが、イリノテカンは大腸癌など数多くの癌に適応があるため、今後有効な検査になると思われる。現在、大腸癌、子宮頸癌、卵巣癌でイリノテカン投与時に、UGT1A1 遺伝子多型解析(\*6、\*27、\*28)により副作用予測を実施している。

この他、5-FU 代謝酵素 Dihydropyrimidine dehydrogenase、シクロフォスファミド代謝酵素 CYP2C19、ワルファリン代謝酵素 CYP2C9、VKORC1 遺伝子変異解析が進行中である。

現在解析可能な薬剤は当院内で使用される品目数の5%に過ぎず、診療科からの要望にまだまだ応えきれていない。今後、データマイニングを行い、エビデンスを蓄積することにより、取り扱い薬剤数を徐々に増やしたいと考えている。

オーダーメイド薬物療法を進める上でもっとも重要な問題は、解析結果の活用である。現在の遺伝子解析技術があれば遺伝子解析自体に何ら問題はないであろうし、現在重要視されている標準化が進めば、どの施設でも同様に安定した結果が出るようになるだろう。解析結果をどのように解釈し、どのように臨床応用するかということである。薬剤の作用や副作用は代謝酵素だけでなく、年齢、性別、体格や基礎疾患など多くの因子が関与しているため、代謝酵素遺伝子多型の薬剤作用や副作用への寄与を明確にし、そこから薬剤投与量の調節アルゴリズムを作成すべきと思われる。遺伝子型によりどういった薬剤を選択し、投与量はどうかという投薬アルゴリズム作成には、診療科とのより密接な連携が必要であり、解析技術同様、投薬アルゴリズムの標準化も必要となってくるであろう。

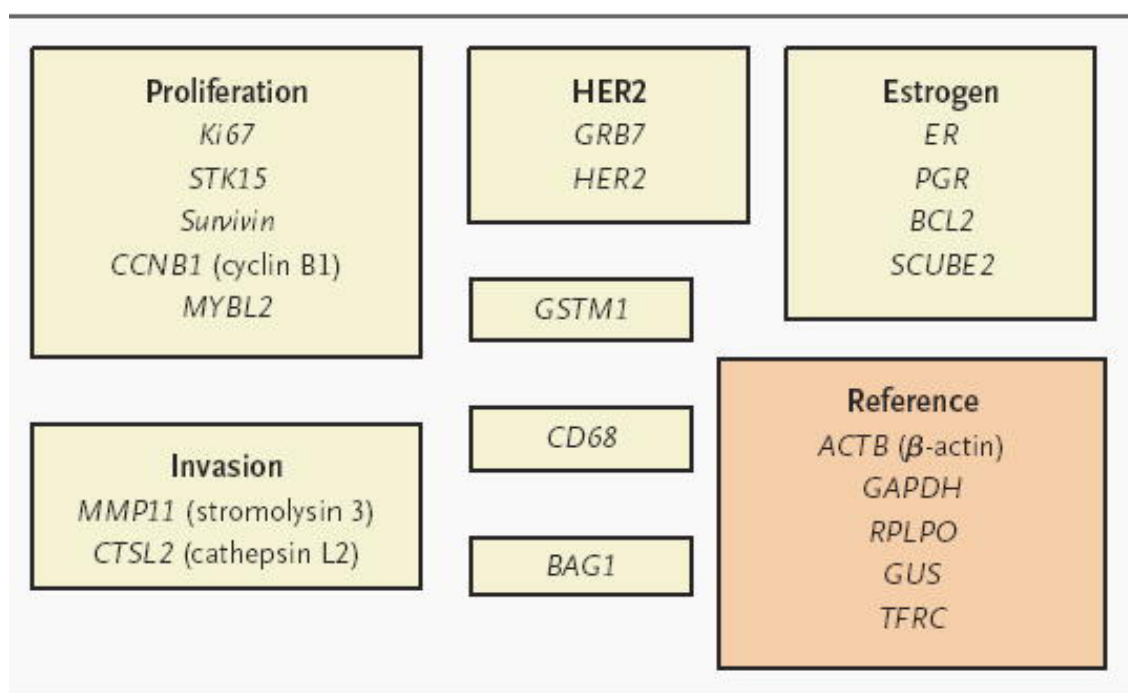
## 固形腫瘍の遺伝子診断

山口大学大学院医学系研究科臨床検査医学分野

日野田裕治

発現する遺伝子の非特異性と腫瘍の異質性のために、固形腫瘍を病原微生物のように遺伝子診断法で確定診断することは、特殊な例を除けば極めて困難である。しかしながら、個別化医療の考え方が浸透して、治療方針の決定に有用な情報としての遺伝子診断が注目されている。

Oncotype DX™ は乳癌のcDNAマイクロアレイによる網羅的解析の結果選択された 21 遺伝子(下図)の発現を、定量RT-PCR法で調べることによって Recurrence Score™ を計算し、最初の診断から 10 年以内の再発率を予測する診断法である。これによって予後不良群を同定し、術後化学療法の方針決定に貢献するのが目的である。最近の検討では、これら 21 遺伝子の中で、とくに細胞増殖に関連するものの重要性が示唆されている。



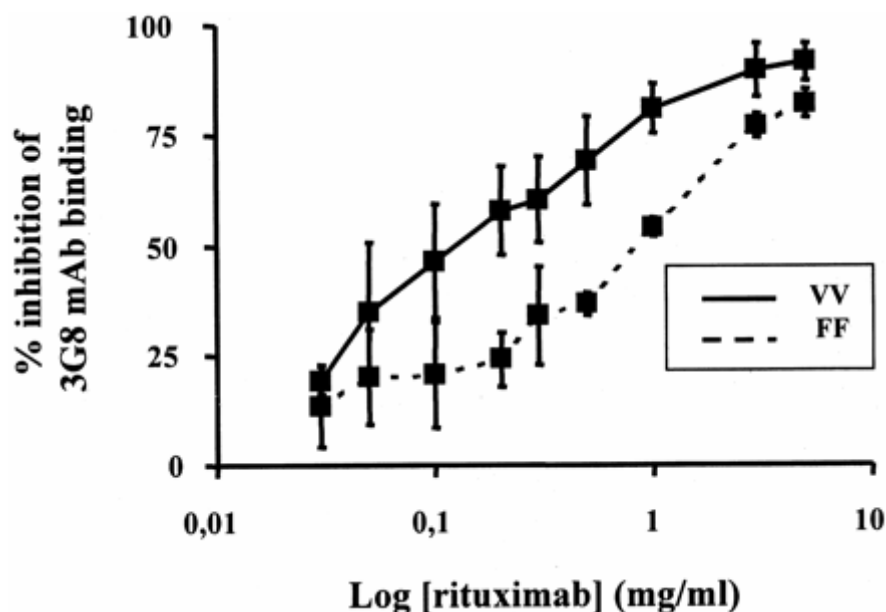
(Soonmyung et al, N Engl J Med,

2004)

Epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子は HER2 に続く分子標的治療の標的遺伝子として、多くの小分子治療薬(チロシンキナーゼ阻害薬)やモノクローナル抗体の臨床応用が進められている。肺癌に対するチロシンキナーゼ阻

害薬の効果と EGFR 遺伝子変異との関連が証明され応用されつつあるが、最近、大腸がんにおける EGFR 遺伝子増幅とモノクローナル抗体の治療効果との関連が示され注目されている。

モノクローナル抗体の治療効果には antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)が関与するが、Fc  $\gamma$ -receptor IIIA (CD16a) の単一塩基置換 (SNP) Val158Phe が抗体のアフィニティを変化させる (下図) ことによって治療効果にも影響することが示されている。



(Dall'Ozzo et al, Cancer Res,

2004)

トポイソメラーゼ阻害薬であるイリノテカンの副作用発現とその代謝に関する uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) 遺伝子のプロモーター領域 TA6/TA7 多型との関連が明らかにされ、用量調節の指標として臨床応用されつつある。2005 年 8 月には本多型を invader 法で検出する診断法が、がんの遺伝子多型診断法としては初めて米国食品医薬品局 (FDA) の認可を得た。下に FDA 文書の抜粋を示す。

#### Patients with Reduced UGT1A1 Activity

Individuals who are homozygous for the UGT1A1\*28 allele are at increased risk for neutropenia following initiation of CAMPTOSAR treatment. A reduced initial dose should be considered for patients known to be homozygous for the UGT1A1\*28 allele (see DOSAGE AND ADMINISTRATION). Heterozygous patients (carriers of one

variant allele and one wild-type allele which results in intermediate UGT1A1 activity) may be at increased risk for neutropenia; however, clinical results have been variable and such patients have been shown to tolerate normal starting doses.

我々も約1年前より大腸がんの化学療法に応用しており、有用性を認める一方で、その限界も明らかになりつつある。

遺伝子多型は疾患感受性との関りから、がんの一次予防への応用、すなわち発症前診断法として大いに期待された。しかし、SNPを中心としたこれまでの膨大な研究によっても未だ実現の可能性は見えていない。その理由と今後の展望についても考察してみたい。