

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09943

研究課題名(和文) 本態性血小板血症の遺伝子情報に基づく個別化治療の実現

研究課題名(英文) Individualized pharmacotherapy for essential thrombocythemia using pharmacogenomic information

研究代表者

高橋 晴美 (Takahashi, Harumi)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20211344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本態性血小板血症治療薬アナグレリド(ANA)は約30%の患者が不応答性を示す。本研究は順天堂大学と関連病院の本疾患患者を対象にカルテ調査を行い、ANA不応答の影響因子を明らかにした。ロジスティック解析では不応答の有意な影響因子として、ヒドロキシウレア(HU)の治療歴と脂質異常症が抽出された。HUの治療歴のない患者ではJAK2遺伝子変異が関与していた。更に母集団薬物動態法によりANA投与後の血小板数の時間推移とID50の変動要因解析に成功した。HUの治療歴が血小板減少率を低下し、HUの治療歴がない患者では、喫煙とスタチン併用が血小板減少率を上昇する因子であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アナグレリドは二次発がんリスクがないため、本態性血小板血症(ET)治療薬として有用性が高い。しかし、約30%の患者は本剤に不応答性を示す。本研究はカルテ調査を基に多変量解析により、ANA投与量と血小板減少効果の関係に影響する可能性のある因子(ヒドロキシウレアの治療歴、JAK2遺伝子変異とスタチンの併用)を明らかにした。

ANA不応答の影響因子について遺伝子情報を含めて詳細に検討した報告はこれまでになく、本研究は学術的意義が高い。更に、薬価が高いANAの治療効果の影響因子を同定できたことは、不応答による増量と副作用を回避できET治療薬の選択に利用できるため、医療経済の面からも有用性が高い。

研究成果の概要(英文)：Although the use of Anagrelide (ANA) for essential thrombocythemia (ET) has been increasing, nearly 30% of patients may be non-responders. The goal of this study was to investigate factors associated with non-responders. Demographic, clinical and genotypic (8 genes) factors were studied retrospectively in 120 ET patients. A non-responder was defined using the platelet reduction rate and the platelet count. Multivariate analyses were performed to identify the covariates affecting a non-responder. A total of 107 patients were included in the analyses, and 30 patients (28%) were non-responders. Pretreatment with hydroxyurea (HU) and hyperlipidemia for all patients and JAK2 mutation in patients without HU were significant covariates influencing a non-responder. Pretreatment with HU for all patients, and statin treatment and smoking history in patients without HU were covariates for ID50. All results indicated that HU and JAK2 mutation might reduce and statins increase the responses of ANA.

研究分野：薬物動態学

キーワード：アナグレリド 本態性血小板血症 non-responder 個別化治療 ヒドロキシウレア JAK2遺伝子変異
スタチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本態性血小板血症(essential thrombocytosis; ET)は、巨核球の異常増生による血小板数の顕著な増加、血栓症、出血や脾腫を呈する造血器の良性腫瘍である。治療の主眼は、血栓症や出血のコントロールであり、血小板数が比較的少ない患者には、血栓症を予防するために低用量のバイアスピリンが投与される。一方、血小板数の増加が顕著な患者は、逆に出血傾向になることから、出血を促進するバイアスピリンは使用できない。そのため、血小板数が多い症例に対しては、ヒドロキシウレアを用いた細胞減少療法が行われてきた。しかし、ヒドロキシウレアは、DNA 損傷を引き起こすことから、二次発がんのリスクや催奇性が指摘されており、妊娠可能な女性には原則使用することができない。

(2) このような状況において、本邦で 2014 年に ET 治療薬として承認されたアナグレリドは、作用機序が未解明であるものの、著明な血小板減少効果を有し二次発がんリスクもない。このため、若年者に対してもより安全な ET 治療薬としてその使用が期待されている。しかし、**約 30% の患者が本剤に不応答 (NR; non-responder) であることが報告されており、さらに薬価が高く、投与初期の軽度な副作用のために、薬効が確認される前に投薬を中止する患者も少なくない。**そのため、**本剤の治療効果の有無を投薬前に判定できるマーカーの同定が医療経済の面からも必要とされている。**

2. 研究の目的

(1) 生体内の薬物応答性の個体差は、薬物動態(PK; 投与量-血中濃度の関係)と薬物感受性(PD; 血中濃度-血小板減少効果の関係)の 2 つのステップの個体差により生じる。そこで研究代表者らはアナグレリドの non-responder に関与する影響因子を明確にするため、まず**カルテ調査**により投与量と血小板減少効果の関わりに影響する可能性のある PK と PD 因子を調査することにした。ついで**ロジスティック解析、並びに母集団解析法により non-responder の寄与因子を明らかにし、最終的には ET の個別化治療の実現を目的とした。**

(2) 報告されている日本人患者のアナグレリド血中濃度データ(Okamoto S et al, Int J Hematol, 2013;97:360-368)¹ を用いて薬物動態 (PK) に関する予備的検討を行った結果、血小板を減少させるために 4mg/d 以上を必要とした患者群では、4mg/d 以下で血小板数をコントロールできた奏功群と比較して、アナグレリドの経口クリアランス(患者の肝薬物代謝能/生物学的利用率の指標)が有意に大きいことを見出した。これは、本剤の経口クリアランスに関与するトランスポーターや薬物代謝酵素などの遺伝学的背景が患者ごとに異なり、本剤への応答性の違いを生み出していることを強く示唆している。一方、アナグレリドは経口投与後消化管から約 70% 以上が吸収されるが、全身循環に到達するのはラットでは 8% にすぎず(ヒトの生物学的利用率は未報告)、その大部分は吸収後腸管からの排出や肝臓における代謝(初回通過効果)により取り除かれてしまうと考えられる。そこで、これらの経口クリアランスに関与する因子を対象として PK の個体差に影響すると考えられる各種遺伝子の SNPs とその出現頻度を検索した結果、消化管排出トランスポーターである P-糖蛋白と BCRP、及びアナグレリドの肝代謝酵素の誘導に関与する CYP1A2*1F などが抽出された。一方で、ET という病態に関与していることが報告されている JAK2、CALR、と MPL 遺伝子変異がアナグレリドの感受性 (PD) に影響していることも考えられるため、本研究では、**アナグレリドの PK と PD の個人差に関与する可能性のある候補遺伝子変異の解析法の確立と不応答性との関連について検討することを計画した。**

3. 研究の方法

(1) **倫理承認の取得**; 本研究では、患者の個人情報を含むカルテ調査、並びに研究目的で患者からの採血や遺伝情報の解析を行うことから、研究計画に倫理的な問題が無いことや、医学的かつ科学的な意義があることについて、全研究参加者の所属機関の倫理委員会に諮り、承認を取得した。

(2) **後方視的カルテ調査による血小板減少効果判定と non-responder に関する候補因子の調査**; 順天堂大学附属順天堂医院、浦安病院と練馬病院の血液内科を受診しアナグレリドを処方された ET 患者 120 名について後方視的カルテ調査を実施し、データの欠損がない 107 名を解析対象とした。カルテ調査では患者背景因子(年齢、性、体重・体表面積などの体格因子、喫煙習慣、既往歴・合併症、併用薬など)、アナグレリド投薬開始前後の血小板数、肝機能、腎機能などの臨床検査値の推移を長期間調査した。アナグレリドの効果判定は投薬開始 28 週後の血小板数が以下の ~ の基準のいずれかを満たし、投与開始時の血小板数と比較して 25% 以上の低下 投与開始時の血小板数が 60 万個/μL 以上の患者が 60 万個/μL 未満へ低下 投与開始時の血小板数が 40 万個/μL 以上の患者が 40 万個/μL 未満へ低下、かつ ~ のいずれかを 1 ヶ月以上持続した患者を奏効群 (Responder)、血小板数の減少が認められない患者を不応答群 (non-responder) と分類した。

(3) **アナグレリドの PK と PD に関連する候補遺伝子の SNP 解析**; SNP 解析による効果判定マーカーを絞り込む目的で、SNP 頻度と薬効へ及ぼす影響についてデータベース検索と文献検索を行

った。その結果、アナグレリドの肝代謝と消化管排出に関与する可能性のある PK 関連遺伝子として *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP3A5*, *P-GP*, *BCRP* と病態関連遺伝子 *JAK2*, *CALR*, *MPL* を解析対象遺伝子として絞り込み、遺伝的多型(SNP)解析の条件を検討・確立し、SNP 解析を実施した。

(4) ロジスティック解析による non-responder に寄与する要因解析; 107 名中 77 名が responder 群 (R), 30 名が non-responder 群 (NR; 28%) と分類された。Responder 群と non-responder 群間で有意差が認められた項目は、投与前血小板数 (NR で低い)、脂質異常症の既往 (NR で少ない)、ヒドロキシウレア (HU) の前治療歴 (NR で多い) であった。*JAK2* 変異出現頻度は NR 群で R 群に比較して高い (70% vs 50%) 傾向を示した。まず、連続変数である調査項目については正規性の検定後、R/NR 群間に有意差 ($P < 0.2$) が認められた因子を選択した。選択された因子間で内部相関性 ($P < 0.05$) が認められた因子については、より妥当性の高いと考えられる一方を選択後にステップワイズ法 (JMP Pro14.0) によって NR の影響因子を抽出した ($P < 0.05$)。HU の前治療歴のない患者 (初回治療としてアナグレリド投与が行われた患者 68 名) についても同様に、ロジスティック解析により NR の影響因子について解析を行った。

(5) 母集団解析によるアナグレリド投与後の血小板数減少の時間推移を予測する Dose-Response モデルの構築と影響因子解析; カルテ調査対象患者のうちデータ欠損がない患者 (77 名) とそのうちヒドロキシウレアの前治療歴がない患者 (47 名) の 2 群を対象として、Dose-response モデルを構築するために以下の - の手順で NONMEM7.4.3 を用いて検討した。Base Model (構造モデルと誤差モデル) 構築、多変量解析による ID50 の影響因子の screening、Full Model 構築、ID50 の影響因子の Deletion、Final Model 構築、構築モデルの評価

(6) アナグレリドと主代謝物の血中薬物濃度測定と薬物動態解析; 研究分担者の小松らの所属する順天堂大学付属順天堂医院血液内科を受診し、アナグレリドを投与中の ET 患者のうち、研究参加に同意をした患者を選抜した。当該患者 8 名の末梢血から、確定診断に必要な遺伝子検査と SNP 解析に用いるゲノム DNA を調製した。遺伝子検査の結果と臨床情報を基に、WHO2008 あるいは WHO2016 診断基準に基づき ET の確定診断を行った。次に、アナグレリド連続投与中に投薬前、投薬後 1, 2, 4, 6, 8 時間後に末梢血から血漿を取得し、凍結保存した。血漿検体を外部の測定機関に送付し、アナグレリドとその主代謝産物である BCH24426 濃度を測定した。現在、対象患者のカルテ調査は終了し、測定された血中濃度データと患者の臨床情報を基に PK と PD について母集団薬物動態 (PPK-PPD) 解析を実施し、経口クリアランスと IC50、並びにそれらの変動要因を解析中である。

4. 研究成果

(1) アナグレリドの non-responder に影響する可能性のある候補遺伝子の SNPs の解析条件の確立と多変量解析への応用; アナグレリドの血小板減少効果に関与すると考えられる薬物動態関連遺伝子 (薬物代謝酵素の *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP3A5*, 消化管トランスポーターの *P-GP*, *BCRP* と疾病関連遺伝子 *JAK2*, *CALR*, *MPL*) をアナグレリドの血小板減少と関連性を示す候補遺伝子として絞り込み、これらの遺伝子の SNPs について解析条件を確立し、それらの SNPs の有無をロジスティック解析と母集団解析法の ID50 の多変量解析に個人差の要因として組み込み、解析することを可能とした。

(2) アナグレリドの non-responder の影響因子に関するロジスティック解析; アナグレリドの non-responder となる確率は $\text{Logit}(P) = -1.227 - 0.784 \times \text{脂血異常症の既往歴} + 0.611 \times (\text{ヒドロキシウレア, HU})$ による前治療で表現でき、投与前の血小板数に影響するヒドロキシウレア (HU) の治療歴 ($\text{OR} = 3.4, P < 0.008$) と脂質異常症 ($\text{OR} = 0.21, P < 0.004$) が抽出された。この式の感度、特異度、全体の正解率は 84.4%、50.0%、74.8% であった。HU の前治療によりアナグレリド投与開始前の血小板数が低下し、血小板減少スピードが遅く奏功基準に入りにくくなってしまっている可能性があるため、次いで HU の前治療歴のない患者を対象に同様の解析を行い、non-responder の影響因子を探索した。その結果、non-responder となる確率は $\text{Logit}(P) = -6.407 + 1.201 \times \text{JAK2 変異} - 0.042 \times \text{年齢} - 4.305 \times \text{体表面積} - 0.772 \times \text{脂血異常症の既往歴}$ と表現でき、有意な因子 ($P < 0.05$) として *JAK2* 遺伝子変異 ($\text{OR} = 11.0, P < 0.028$) が non-responder の大きな影響因子であった。感度、特異度、全体の正解率は 97.7%、44.4%、88.7% であった。全患者でも HU 前治療がない患者でも脂血異常症の既往歴が検出されたほか、*JAK2* 遺伝子変異が寄与因子として検出された。HU の前治療による血小板低下率の減少や *JAK2* 変異がアナグレリドの効果に影響する可能性があることはこれまでの研究でも示唆されており、裏付ける結果が得られた。脂質異常症の既往歴に関して、脂質異常症患者に投与されるスタチン薬の治療歴について調査を進めた結果、奏功群と非奏功群間では、投与前の血小板数、ヒドロキシウレアの前治療歴、スタチン薬による治療歴に有意差が認められた。全患者を対象とした non-responder の確率式として $\text{Logit}(P) = -1.429 - 0.823 \times \text{スタチン薬による治療歴}$ ($\text{OR} = 0.19, P < 0.03$) が得られ、スタチン治療が奏功に関与する因子 ($\text{OR} = 5.2, P < 0.03$) として抽出された。

(3) 母集団薬物動態解析法によるアナグレリドの Dose (投与量) - Response (血小板数減少)

関係；アナグレリド投与後の血小板減少の時間推移とその ID50（血小板生成を 50% 阻害する投与量）の変動要因を明確にするために、我々がワルファリンの効果予測に用いた間接反応モデル²をアナグレリド用にモディファイしたところ（Fig.1）投与後の血小板の時間推移を予測することに成功した。このモデルでは PK は血中濃度のデータがないため、体内薬物量 AMT(2) を 1 次吸収過程を含む 1-コンパートメントモデル式(2)で予測し、PD は体内薬物量 AMT(2) の上昇に伴い、時間的遅れを持って血小板生成速度 Kin が抑制される式(3)で表現し、ID50 の影響因子について多変量解析を行った。誤差モデルは混合誤差モデル（全患者、n=77）と相対誤差モデル（HU 前治療歴なし、n=47）をそれぞれ用いて解析を行った。

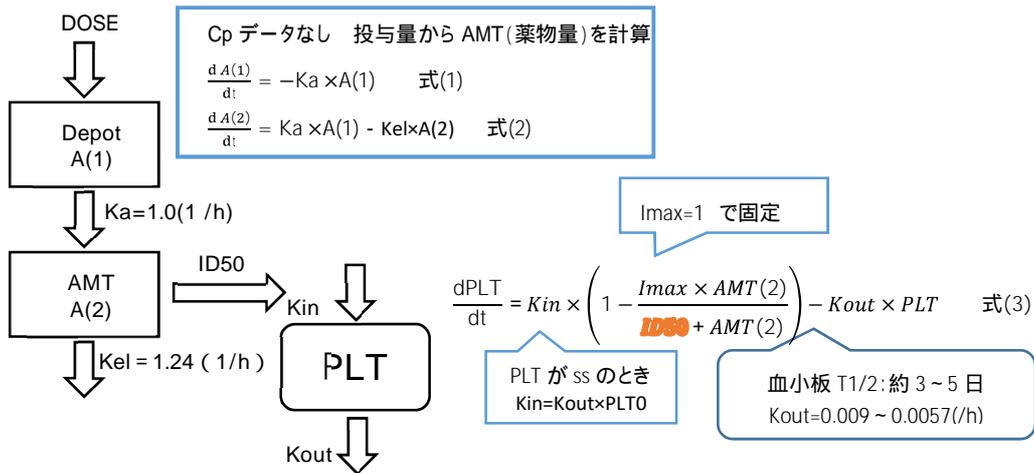


Fig.1 体内薬物量(AMT)の上昇に伴い、時間的に遅れて血小板生成が阻害され血小板が低下する間接反応モデル

全患者(n=77)を対象とした場合の ID50 は式 4 で表現でき、低ヘモグロビン値と HU の前治療歴が血小板減少率を低下させる有意な影響因子として抽出された。

$$ID50 = 0.0169 \times (Hb / 13.4)^{-2.67} \times [6.49]^{HU \text{の前治療歴}} \quad \text{式(4)}$$

得られたモデルから予測された血小板値の予測値と患者の実測値を比較した結果（Fig.2）おおよそ妥当な予測値が得られたと考えられた。この結果を基にモンテカルロ法で 1,000 名の患者を発生させて、アナグレリドの血小板減少効果に及ぼすヒドロキシウレア（HU）の前治療歴とヘモグロビン（Hb）の影響を推定した（Figs.3 & 4）。HU を前治療後にアナグレリドを導入すると血小板減少率が小さい（最終血小板値は低い）と予測され、臨床報告³と一致していた。

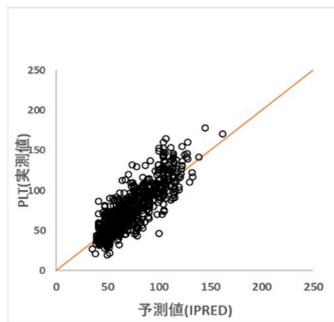


Fig.2 血小板値の予測値と実測値

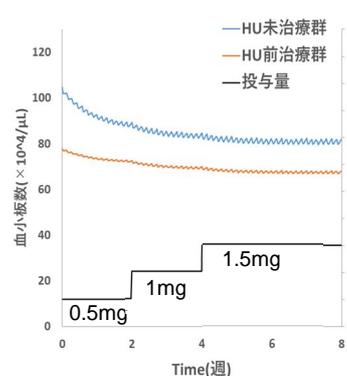


Fig.3 血小板減少に及ぼす HU の影響

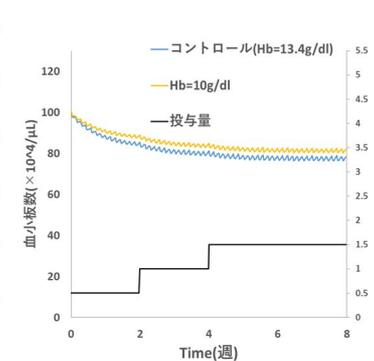


Fig.4 血小板減少に及ぼす Hb の影響

HU の前治療歴のない患者(n=47)の ID50 は式 5 で表現できた。

$$ID50 = 0.028 \times e^{\{0.0297 \times (ALT-18)\}} \times 0.279^{\text{喫煙}} \times 0.459^{\text{スタチンの併用}} \quad \text{式(5)}$$

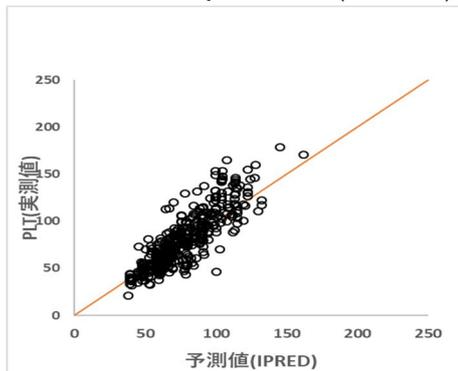


Fig.5 血小板値の予測値と実測値

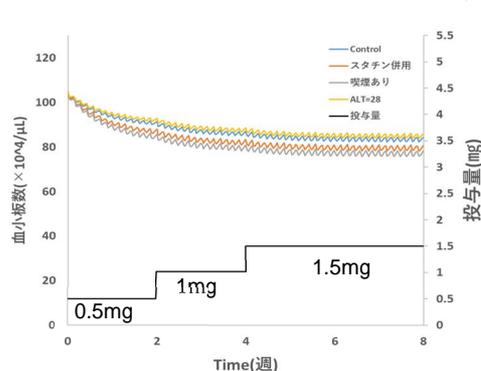


Fig.6 血小板減少に及ぼす ALT、喫煙、スタチン併用の影響

ALT 上昇群が血小板減少率を低下する因子として、喫煙群とスタチン併用群が血小板減少率を上昇する因子として抽出された。得られたモデルから得られた血小板値の予測値と患者の実測値を比較した結果 (Fig.5) おおよそ妥当な予測値が得られたと考えられた。この結果を基にモンテカルロ法で 1,000 名の患者を発生させて、アナグレリドの血小板減少効果に及ぼす ALT、喫煙とスタチン併用の影響を推定した (Fig.6)。アナグレリドによる血小板減少の影響因子としての ALT や喫煙歴については、今後の大規模前向き調査によりその妥当性が証明されなければならない。スタチンに関しては血小板凝集抑制効果を有する報告⁴や JAK2 変異を介した赤血球合成を阻害する報告⁵がなされているため、血小板合成に関してもスタチンの JAK2 変異を介する影響について今後の検討が望まれる。

(4) 母集団解析法による投与量-血中濃度-効果関係 (PPK-PPD 解析); カルテ調査から抽出されたアナグレリドの反応性の影響因子の妥当性を立証するために、アナグレリド投与患者を対象に前向き臨床薬理試験を開始できた。8 名のみであるが ANA と主代謝物の血中濃度と血小板減少の時間推移を測定できたので、今後、薬物動態と感受性の過程に分けて個体差の影響因子について解析することにより、臨床に応用可能なアナグレリドの効果の個体差や不応答性 (NR) の影響因子を抽出できる可能性が期待できる。

< 引用文献 >

Shinichiro Okamoto, Yoshitaka Miyakawa, Jonathan Smith, Ian Hodgson, Brihad Abhyankar, Steven Troy, Yuzuru Kanakura, Open-label, dose-titration and continuation study to assess efficacy, safety, and pharmacokinetics of anagrelide in treatment-naïve Japanese patients with essential thrombocythemia, *Int J Hematol*, 97, 2013, 360-368

Ohara M, Suzuki Y, Shinohara S, Gong IY, Schmerk CL, Tirona RG, Schwarz UI, Wen MS, Lee MTM, Mihara K, Nutescu EA, Perera MA, Cavallari LH, Kim RB, Takahashi H, Differences in warfarin pharmacodynamics and predictors of response among three racial populations. *Clin Pharmacokinet*, 58, 2019, 1077-1089

宮入 泰郎、村井 一範、濱田 宏之、佐藤 彰宣、本態性血小板血症に対するアナグレリド療法の効果と安全性について後方視的解析、*岩手医誌*、69, 2017、117-124

平瀬 徹明、野出 孝一、心血管保護薬としてのスタチンの多面的作用、*膜*、34, 2009, 249-253

Lori N Griner, Kathy L McGraw, Joseph O Johnson, Alan F List, Gary W Reuther, JAK2-V617F-mediated Signalling is dependent on lipid rafts and statins inhibit JAK2-V617F-dependent cell growth, *Br J Haematol*, 160, 2013, 177-187

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohara M, Suzuki Y, Shinohara S, Gong IY, Schmerk CL, Tirona RG, Schwarz UI, Wen MS, Lee MTM, Mihara K, Nutescu EA, Perera MA, Cavallari LH, Kim RB, Takahashi H	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Differences in warfarin pharmacodynamics and predictors of response among three racial populations.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Pharmacokinet	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） :10.1007/s40262-019-00745-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuhiko Asari and Harumi Takahashi
2. 発表標題 Prediction of Warfarin-Sorafenib Interaction in Japanese Patients Using a Population Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model
3. 学会等名 the 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大原みなみ、白石沙紀、鈴木恭彦、MTM Lee, Richard B Kim, Larisa H Cavallari, 高橋晴美
2. 発表標題 ワルファリンの抗凝固効果に及ぼす腎機能低下の影響に関する母集団PK/PD解析
3. 学会等名 第38回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 木島慎一、高橋晴美、緒方宏泰	4. 発行年 2019年
2. 出版社 丸善	5. 総ページ数 14
3. 書名 第4版 臨床薬物動態学：薬物治療の適正化のために	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小松 則夫 (KOMATSU Norio) (50186798)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究分担者	荒木 真理人 (ARAKI Marito) (80613843)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・先任准教授 (32620)	
研究分担者	今井 美沙 (IMAI Misa) (50709003)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (32620)	